

THÈSES

présentées à la

FACULTE DES SCIENCES DE NANCY

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

Kia-Ki HAN

Ingénieur E.N.S.I.C. — Licencié ès-Sciences

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

PREMIERE THESE :

Acides aminés des liquides d'ascite
(Bilan qualitatif et quantitatif,
Etudes de quelques formes combinées d'acides)

DEUXIEME THESE :

Proposition donnée par la Faculté :
La structure des protéines

Soutenues le 1^{er} Juillet 1961, devant la Commission d'Examen

Président M. E. URION

Examineurs }
M. J. BARRIOL
M. S. DAVID
M. G. BISERTE
Dr. P. PAYSANT

THÈSES

présentées à la

FACULTE DES SCIENCES DE NANCY

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

Kia-Ki HAN

Ingénieur E.N.S.I.C. — Licencié ès-Sciences

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

PREMIERE THESE :

Acides aminés des liquides d'ascite

(Bilan qualitatif et quantitatif,

Etudes de quelques formes combinées d'acides aminés)

DEUXIEME THESE :

Proposition donnée par la Faculté :

La structure des protéines

Soutenues le 1^{er} Juillet 1961, devant la Commission d'Examen

Président M. E. URION

Examineurs }
M. J. BARRIOL
M. S. DAVID
M. G. BISERTE
Dr. P. PAYSANT

DOYEN : M. ROUBAULT

ASSESEUR : M. WAHL

DOYENS HONORAIRES : MM. CORNUBERT, DELSARTE

PROFESSEURS HONORAIRES : MM. GUTTON, CROZE, RAYBAUD, LAFFITTE, LERAY, JOLY, LAPORTE EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNE, de MALLEMANN, LONGCHAMBON, LETORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE, GUERIN.

Maîtres de conférences honoraires : MM. RAUX, LIENHART.

PROFESSEURS

MM.		MM.	
URION	Chimie biologique	FRUHLING	Physique
DELSARTE	Analyse supérieure	LIONS	M.M.P.
ROUBAULT	Géologie	SUHNER	Physique exp.
VEILLET	Biologie animale	HILLY	Géologie
ECHEVIN	Botanique	LE GOFF	Génie chimique
WAHL	Chimie Org. indust.	CHAPON	Chimie biologique
BARRIOL	Chimie théorique	HEROLD	Chimie indust.
BIZETTE	Physique	SCHWARTZ	Exploit. minière
GUILLIEN	Electronique	GAYET	Physiologie
GIBERT	Chimie Physique	MANGENOT	Phytopathologie
HERVE	Calcul diff. et Int.	MALAPRADE	Chimie
LEGRAS	Mécanique rationnelle	HADNI	Physique
DAVID	Chimie organique	DELAMARE-DEBOUDEVILLE	Zoologie
BOLFA	Minéralogie	BONVALET	Mécanique physique
NICLAUSE	Chimie Générale	BRUHAT	Mathématiques géné.
FAIVRE	Physique appliquée	Mme ROIZEN	Physique
AUBRY	Chimie minérale	KERN	Minéralogie
DUVAL	Chimie	BASTICK	Chimie
COPPENS	Radiogéologie		

MAITRES DE CONFERENCES

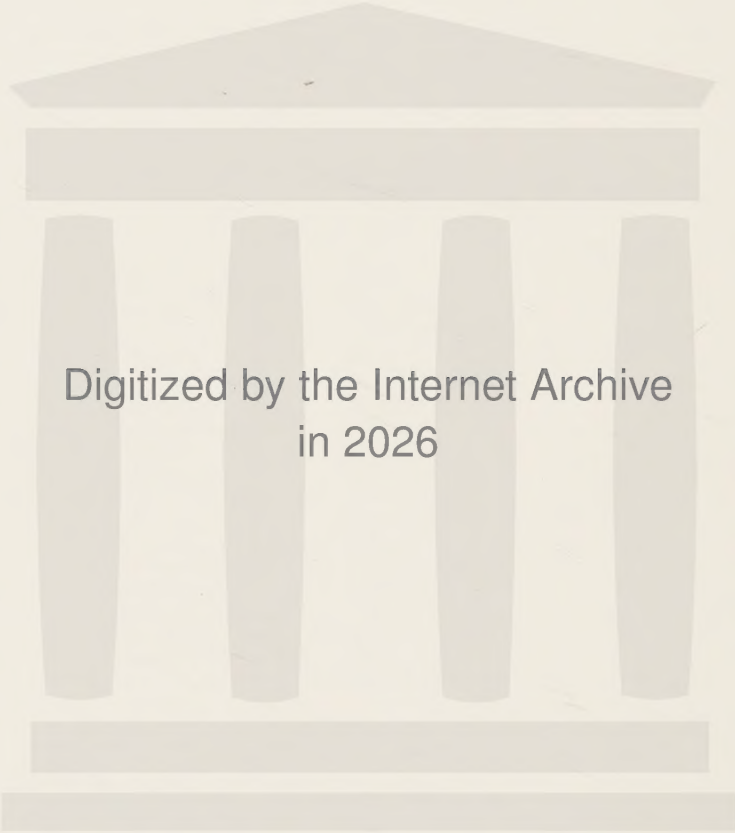
MM.		MM.	
WERNER	Botanique	CLIN	Paléontologie
GARNIER	Agronomie	ROCCI	Géologie
REGNIER	Physico-chimie	WEISS	Physique M.P.C.
WEPPE	Minéralogie appli.	Mme BASTICK	Chimie M.P.C.
BERNARD	Géologie	VUILLAUME	Psychophysiologie
ARAGNOL	Mathématiques (prop.)	PLAN	Mathématiques
RENARD	Physique théo. et nuc.	GUDEFIN	Physique
CONDE	Zoologie	MARI	Chimie
GOSSE	Génie chimique	LAFON	Physique
CHAMPIER	Physique	HORN	Physique
GAY	Chimie Biologique	PIERRET	Maître de conf. adj.

SECRETAIRE : M. CARON



A LA MEMOIRE DE MON FRERE,
A TOUS LES MIENS.





Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES MAITRES

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BOULANGER,

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine et de
Pharmacie de Lille.

Membre correspondant à l'Académie de Médecine.

Chevalier de la Légion d'Honneur.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. BISERTE,

Professeur de Chimie Clinique à la Faculté de Médecine et de
Pharmacie de Lille.

Docteur ès Sciences.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

ET

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGÉ E. DE LAVERGNE,

Maître de Conférence Agrégé à la Faculté de Médecine de Nancy.

Directeur du Laboratoire Central des Cliniques.

En hommage respectueux.

AVANT PROPOS

Le présent travail a été effectué avec l'assentiment de Monsieur le Doyen Urion, Professeur à la Faculté des Sciences, Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Brasserie, sous la haute direction de Monsieur le Professeur Biserte, dans les laboratoires de Monsieur le Professeur Boulanger et de Monsieur le Professeur agrégé de Lavergne.

Nous prions Monsieur le Doyen Urion d'agréer l'expression de notre respectueuse reconnaissance pour avoir bien voulu superviser l'ensemble de notre travail et accepter la présidence de notre jury.

Nous sommes heureux d'avoir l'occasion d'adresser à notre Maître, Monsieur le Professeur Boulanger, notre gratitude pour la sollicitude qu'il nous a sans cesse témoignée comme Parrain au Centre National de la Recherche Scientifique, et pour la confiance qu'il a bien voulu nous accorder en nous intégrant au sein de son équipe après cette thèse.

Nous remercions Monsieur le Professeur Biserte de tous les conseils et de l'aide qu'il n'a cessé de nous prodiguer durant la réalisation de notre thèse. Il a guidé nos premiers pas vers la Recherche Scientifique. Nous avons été particulièrement sensible à la bienveillance confiante et sans réserve qu'il ne nous a pas ménagée et qui a été pour nous un encouragement et un réconfort.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Agrégé E. de Lavergne pour l'aide matérielle, les facilités de travail, l'accueil chaleureux et amical qu'il nous a constamment apportés pendant tout le long de ce travail. Nous l'assurons de notre fidèle attachement.

Nous exprimons notre gratitude à Messieurs les Professeurs Barriol et David qui ont examiné avec attention notre thèse et ont choisi notre second sujet.

Nous devons à nos deux guides et amis les Docteurs Paysant et Boulangé de précieux conseils et une collaboration amicale; durant la première année de nos recherches, le Docteur Boulangé, Ancien Interne des Hôpitaux, chef de travaux à la Faculté, nous initia aux techniques d'analyses

chromatographiques et électrophorétiques qualitatives au Laboratoire central des cliniques. Nous avons été ensuite heureux de pouvoir progresser dans nos travaux grâce aux discussions fructueuses et à l'expérience du Professeur agrégé Paysant, dont nous connaissons déjà les remarquables qualités d'enseignant. Il ne nous a ménagé ni ses conseils, ni son temps et nous le prions de croire à notre entier dévouement.

Nous n'oublierons pas tous ceux qui nous ont aidé dans notre travail, en particulier le Docteur Peters, Ancien Interne, Assistant des Hôpitaux, qui a confirmé, par ses talents de cytologiste, la nature de nos liquides d'ascite néoplasique; Monsieur Marine, Photographe, qui a reproduit nos clichés aussi bien pour la première thèse que la seconde, ainsi que tout le Corps Médical du Centre Hospitalier de Nancy dont la compréhension, la collaboration, et les services désintéressés ont été les éléments indispensables de nos propres réalisations.

Nous désirons témoigner à Monsieur le Directeur Général du Centre National de la Recherche Scientifique notre profonde reconnaissance pour l'aide et les facilités qu'il nous a accordées en nous acceptant au sein de cette Grande Communauté Scientifique.

ACIDES AMINES

DES LIQUIDES D'ASCITE

**(Bilan qualitatif et quantitatif,
Etudes de quelques formes combinées
d'acides aminés)**

PREMIER CHAPITRE

I. — TECHNIQUES GENERALES

Avant de décrire l'ensemble des travaux qualitatifs et quantitatifs et d'en donner les résultats, il nous a paru utile de rappeler, en détail, les techniques que nous avons utilisées pour mener à bien ce travail.

A. — *Déminéralisation et fractionnement de base des milieux biologiques par l'utilisation de résines échangeuses d'ions.*

L'emploi des résines échangeuses d'ions a été souvent préconisé comme méthode de déminéralisation et de fractionnement dans l'étude des milieux biologiques en général (urine, sérum, liquide pleural, liquide d'ascite...). En effet, le traitement par les résines à échange d'ions permet une déminéralisation complète des milieux biologiques et constitue ainsi un stade préparatoire indispensable à l'étude par la chromatographie de partage sur papier, des amino-acides et de leurs formes combinées, peptidiques ou non. Ces résines peuvent en outre servir à une simplification des milieux biologiques et permettent un fractionnement partiel destiné à faciliter leur étude. Plusieurs méthodes générales de traitement par résines échangeuses d'ions ont été proposées dans la littérature.

Nous ne décrivons ici que la méthode que nous avons utilisée au cours de ce travail expérimental et qui est celle proposée par P. BOULANGER et Coll. (1).

Le liquide biologique filtré (urine, sérum, liquide pleural...) est passé sur un échangeur de cations fortement acide de type polystyrène sulfoné (Amberlite IR 120, 300 g environ de résine humide pour 200 ml de liquide biologique) *.

Après lavage discontinu de la résine à l'eau distillée (environ 3 l d'eau distillée), les acides aminés libres (sauf la taurine) et les peptides, retenus par la résine, sont élués par de l'ammoniaque 2 N, concentration qui est

* Ce volume peut être réduit jusqu'à 10 ml pour étude de certains milieux biologiques tels que sérum, liquide céphalo-rachidien, etc... Dans ces cas, l'agitation du liquide biologique avec la résine est effectuée grâce à un agitateur magnétique pendant une heure.

nécessaire pour déplacer l'arginine (2) (environ 1.500 ml NH_4OH 2 N pour les quantités indiquées).

L'éluat, débarrassé de l'ammoniaque par un courant d'air à froid, est concentré presque jusqu'à sécheresse, soit par une ventilation continue, soit dans un évaporateur rotatif à 37° C.

L'éluat est repris par 5 ml d'alcool isopropylique à 10 % vol/vol. C'est sur cette solution que nous désignons sous le terme de fraction « A », que les diverses investigations chromatographiques et électrophorétiques sont pratiquées.

B. — *Chromatographie bidimensionnelle.*

Papier Whatman n° 1.

Les chromatographies bidimensionnelles descendantes sont réalisées avec les deux systèmes solvants suivants :

— Première dimension avec le solvant butanol-acide acétique-eau, 4 : 1 : 5. (3).

— Seconde dimension avec le phénol tamponné à pH 9,3 (4) par un tampon borate de composition :

Acide borique 0,1 N	200 ml
Soude 0,1 N	113 ml

Les cuves de chromatographie employées sont des modèles classiques. Elles sont entièrement construites, ainsi que leurs godets, en chlorure de polyvinyle, donc légères, très robustes et d'entretien facile *.

La chromatographie est effectuée dans une pièce à température constante ($20^\circ \text{C} \pm 1$). La durée en première dimension est de 36 h.-40 h. (57 cm) et de 20 à 24 h. en seconde dimension (46 cm).

Cette technique donne un aperçu général de la répartition des acides aminés. Elle est facile à mettre en œuvre (directement à partir de la fraction « A »). Mais certaines régions sont difficiles à interpréter, notamment la zone des acides aminés basiques.

C. — *Electrophorèses.*

a) *Electrophorèse à pH 3,9.*

Cette électrophorèse est réalisée sur papier Arches 304 en petite dimension (28×40 cm), dans un appareil en V renversé (type Durrum). Nous

* Mécaplastic, rue du Vieux-Four, MARCQ-EN-BAROEUL (Nord).

utilisons le tampon de pH 3,9 proposé par MICHL (5) et dont voici la composition :

Pyridine — Acide acétique — Eau (30 : 100 : 4.870).

La migration électrophorétique est réalisée pendant 3 ou 4 heures sous un potentiel de 380 volts. Le produit (fraction « A ») est déposé à l'aide d'une micropipette à 12 cm du bord anodique de la feuille, perpendiculairement au grand axe de la feuille sur une longueur de 1,5 à 3 cm selon l'importance du volume à déposer (ce volume est préalablement déterminé par un essai de concentration).

Pour obtenir une séparation plus nette, cette électrophorèse à pH 3,9 peut être également réalisée en grande dimension (46 × 57 cm) sur papier Whatman n° 1. les conditions expérimentales sont identiques, mais la durée est de 8 heures pour un dépôt situé à 20 cm du côté anodique et de 14 heures pour un point de dépôt à 25,5 cm du côté anodique.

La cuve d'électrophorèse en V renversé est entièrement construite en chlorure de polyvinyle *. La longueur des bacs à tampon est de 68 cm ; les bacs sont indépendants de l'appareil: une électrode en platine est placée directement à l'une des extrémités de chaque bac. A la partie supérieure de la plaque médiane une tige de verre est placée pour supporter directement la feuille de papier (6).

Ce n'est pas une méthode d'identification, mais une méthode de simplification, qui permet d'obtenir une séparation de groupes (Acides Cystéïques, Aspartique, Glutamique, « Neutres », « Basiques » et Amines biologiques).

b) *Electrophorèse à pH 11,7.*

Cette électrophorèse peut être réalisée, en qualitative, en petite dimension sur papier Arches 304 (27 × 40 cm). L'électrolyte est constitué par une solution d'ammoniaque N. (pH voisin de 11,7). Dans le type d'appareil en V renversé précédemment décrit, on utilise un potentiel de 380 volts pendant 14 heures, le dépôt étant effectué à 11 cm du bord cathodique de la feuille.

Elle peut être également effectuée, en grande dimension, sur papier Whatman n° 1 (46 × 57 cm) sous un potentiel de 380 volts pendant 14 heures, le point de dépôt étant situé à 10 cm de l'extrémité *cathodique*.

Elle permet de séparer les acides aminés à comportement « basique » : histidine, arginine, lysine, et ornithine.

* Mécaplastic (voir plus haut).

c) *Electrophorèse à pH 6,5.*

La composition du tampon de pH 6,5 est la suivante :

Pyridine — Acide Acétique — Eau (200 : 8 : 1.792) (7).

L'électrophorèse est pratiquée sur papier Whatman n° 1 (57 × 46 cm) dans le même type d'appareil, pendant 15 heures sous un potentiel de 380 volts, le dépôt étant effectué à 28,5 cm du bord cathodique de la feuille. Grâce au déplacement des bacs à électrodes, le papier est disposé de façon dissymétrique avec un côté cathodique plus long (30,5 cm) que le côté anodique (26,5 cm).

Elle permet de séparer la méthyl-histidine de l'histidine.

D. — *Couplages bidimensionnels (Electrophorèse + Chromatographie).*

a) *Electrophorèse à pH 3,9 — Butanol acétique.*

Ce couplage bidimensionnel comporte une électrophorèse à pH 3,9 suivie en deuxième dimension d'une chromatographie descendante dans le système butanol-acide acétique-eau (voir I-B).

Le dépôt est effectué sur une feuille de papier Whatman n° 1 (57 × 46 cm), en un point situé dans un coin de la feuille de papier à 20 cm ou 25,5 cm du côté anodique et à 10 cm de l'autre bord.

L'électrophorèse en première dimension est réalisée dans un appareil de grande dimension en V renversé, sous 380 volts, pendant 8 ou 14 heures, dans le sens de la plus grande longueur de la feuille. Après séchage sous une hotte par ventilation d'air froid, la chromatographie descendante (deuxième dimension) est réalisée perpendiculairement au sens de la migration électrophorétique dans le système classique butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5), pendant 24 à 30 heures.

Ce couplage permet d'avoir une séparation très satisfaisante de l'acide cystéique, de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, des différentes formes du glutathion, de l'acide alpha-aminoadipique, de la beta-alanine, de l'acide beta-amino-isobutyrique, de l'acide gamma-amino-butyrique et de nombreuses formes combinées.

b) *Electrophorèse à pH 2,4 — Butanol acétique.*

Ce couplage bidimensionnel comporte une électrophorèse à pH 2,4 suivie en deuxième dimension d'une chromatographie descendante dans le système butanol-acide acétique-eau.

L'électrophorèse en première dimension est réalisée dans le même type

de cuve que précédemment sur papier Whatman n° 3 (57 × 46 cm) sous 380 volts, pendant 18 à 20 heures dans le sens de la plus grande dimension de la feuille, le point de dépôt se trouvant à 10 cm du bord anodique et à 10 cm de l'autre bord. L'électrolyte est constitué par une solution d'acide acétique *N* de pH voisin de pH 2,4.

Après séchage de la feuille à *température ordinaire*, cette électrophorèse est suivie d'une chromatographie unidimensionnelle descendante dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) effectuée dans le sens perpendiculaire à la migration électrophorétique et la durée est de 18 à 22 heures.

La résolution des acides aminés « Neutres » par cette technique est très satisfaisante. C'est ainsi que la sérine et le glycocolle, la méthionine et la valine, la phényl-alanine et les leucines sont nettement séparées. Mais elle ne permet pas de séparer la méthionine-sulfone de la méthionine-sulfoxyde, ni la citrulline de la glutamine, ni la leucine de l'isoleucine.

* * *

E. — *Discussion des techniques.*

Les différentes techniques que nous venons de décrire permettent une bonne séparation des acides aminés des liquides biologiques.

Débarassés de leurs sels minéraux et de substances chromatographiquement gênantes, soumis par ailleurs à un fractionnement de base grâce à l'emploi de résines échangeuses d'ions, ces milieux biologiques se prêtent alors à une bonne séparation de leurs acides aminés.

Une carte générale permettant de se faire une idée globale de la séparation des acides aminés est obtenue par la simple chromatographie bidimensionnelle. Mais la multiplicité des taches et la complexité particulière de certaines régions du chromatogramme nécessitent une exploration méthodique des divers groupes d'acides aminés.

Les acides aminés dicarboxyliques peuvent être séparés individuellement par l'électrophorèse à pH 3,9 qui permet en outre une excellente séparation de groupe des « acides aminés neutres » et « acides aminés basiques », ainsi que celles des ω aminoacides (beta-alanine, acide beta-amino-isobutyrique, acide gamma-amino-butyrique...) et des amines biologiques.

Le groupe des aminoacides « Neutres » peut être parfaitement résolu par le couplage bidimensionnel pH 2,4-Butanol acétique, tandis que le problème posé par le groupe des « amino-acides basiques » peut être efficacement abordé par les électrophorèses à pH 11,7 et à pH 6,5.

L'intérêt que présentent ces diverses techniques réside dans le fait qu'elles peuvent être successivement et séparément mises en jeu grâce à un dispositif automatique et quantitatif d'élution proposé par G. BISERTE (8).

Ainsi le groupe des dérivés « Neutres », préalablement séparé à pH 3,9 pourra être élué et repris isolément par l'une ou l'autre des techniques qui permettent sa résolution (chromatographie bidimensionnelle, couplage bidimensionnel, pH 2,4-butanol-acétique).

Il en est de même des dérivés « Basiques » qui, après séparation de groupe à pH 3,9, pourront être étudiés séparément (chromatographie bidimensionnelle, électrophorèse à pH 11,7, électrophorèse à pH 6,5).

Soumis à des procédés multiples de séparation reposant sur des principes différents (chromatographie mettant en jeu des solvants divers, électrophorèses pratiquées avec des tampons différents), les nombreux constituants de la fraction « A » des milieux biologiques (acides aminés et leurs formes combinées), peuvent ainsi être séparés de façon satisfaisante pour permettre leur identification certaine.

Cette identification pourra naturellement être confirmée par l'utilisation de témoins internes et latéraux, ainsi que par l'emploi des révélations spécifiques.

Ces déterminations étant pratiquées avant et après hydrolyse totale, la séparation pourra ainsi, non seulement porter sur les acides aminés libres, mais également sur leurs formes combinées.

En conséquence, nous voulons décrire succinctement le dispositif d'élution, les techniques qui utilisent les témoins externes et internes, les révélations spécifiques, les conditions d'hydrolyse, ainsi que la résolution de problèmes délicats d'identification.

*

**

II. — TECHNIQUES PARTICULIERES.

A. — *Elution des bandelettes.*

Sur une partie de l'électrophorégramme à pH 3,9, non révélé à la ninhydrine, l'emplacement des divers acides aminés est repéré grâce à l'emploi de témoins latéraux: la bandelette correspondant au groupe d'acides aminés à étudier (le groupe des « Neutres », et des « Basiques ») peut être simplement éluée en la découpant et en plaçant les fragments dans un tube à centrifuger contenant 2 à 3 ml d'eau distillée pendant quelques heures:

après agitation. l'éluat est évaporé à sec et repris dans un petit volume d'eau; c'est cette solution qui pourra être soumise à de nouvelles investigations soit électrophorétiques, soit chromatographiques.

Pour les déterminations quantitatives, l'élution est effectuée à l'aide de l'appareil d'élution proposé par BISERTE (8).

Ce dispositif automatique d'élution comporte essentiellement 3 parties :

a) Une seringue à débit constant, très lent, dont le piston est mené par un moteur asynchrone type 706-24 (vitesse : 1 T/24 h.).

b) Dispositif d'élution, construit en plexiglas. Il possède une plaque et une chambre d'élution qui lui est perpendiculaire. La bande à éluer est fixée dans la chambre à élution de façon à la faire affleurer, par son extrémité inférieure, à la feuille réceptrice.

c) Le support de la feuille « réceptrice ». Il est constitué par une plaque de plexiglas de 60 × 15 cm sur laquelle vient reposer horizontalement la feuille réceptrice. La plaque porte en son centre un orifice rectangulaire de 5 × 2,5 cm de façon à permettre un soufflage d'air froid ou d'air chaud, grâce à une soufflerie d'air chaud, disposée à une distance appropriée sous l'orifice.

Le moteur qui actionne le piston de la seringue remplie d'eau distillée est mis en marche. Lorsque le front du liquide d'élution atteint la feuille réceptrice posée sur son support, la soufflerie est mise en route. L'écoulement et la ventilation sont maintenus pendant le temps nécessaire à l'élution totale.

Ce dispositif permet une élution quantitative, que l'on peut contrôler par la négativité de la réaction à la ninhydrine que doit donner la bande éluee.

B. — *Emploi de témoins.*

a) Des acides aminés témoins peuvent être soumis à une même séparation électrophorétique ou chromatographique que la fraction « A » du milieu biologique à analyser.

Ils seront ainsi utilisés simultanément et dans les mêmes conditions que le produit à étudier comme témoins externes, soit en mélange sous forme d'un dépôt unique, soit individuellement sous forme de dépôts séparés si leur localisation électrophorétique ou chromatographique est mal déterminée.

b) De la même façon, des témoins *externes* peuvent, en chromatographie bidimensionnelle, servir à l'identification probable d'amino-acides.

En traçant les coordonnées des taches ninhydrine positives obtenues dans les deux systèmes solvants par ces témoins latéraux, on peut en effet déterminer les RF et donc la localisation des amino-acides correspondants du milieu biologique.

c) De même l'utilisation d'acides aminés connus sous forme de témoins internes permet généralement de confirmer ou d'infirmer la présence d'un amino-acide supposé présent dans le milieu biologique.

C. — *Emploi des révélations à la ninhydrine et des révélations spécifiques.*

a) *Révélation à la Ninhydrine (qualitative).*

1° *Ninhydrine à 0,1 % dans n-butanol.*

Les solvants qui imbibent la feuille sont éliminés par chauffage dans une étuve spécialement construite à cet usage (9).

On pulvérise sur le chromatogramme la solution diluée de la ninhydrine. On le place ensuite dans une étuve à 100° C pendant 30 minutes environ.

On obtient une coloration violette pour la plupart des acides aminés, sauf pour la proline (jaune), l'hydroxy-proline (orange), l'acide pipécolique (bleu), l'asparagine (jaune-brun), la carnosine (verte), l'histidine et la méthyl-histidine (grise) et la sarcosine (rougeâtre).

La conservation de la coloration du chromatogramme pose des problèmes délicats. On peut le conserver à l'obscurité dans un dessiccateur en atmosphère d'azote ou bien on peut le pulvériser par le réactif de KAWERAU * (10).

2° *Ninhydrine à 1 % dans l'acétone contenant 10 % de tampon phosphate 0,05 M de pH 7.*

Après séjour dans l'étuve à 80° C. pendant 30 minutes, tous les acides aminés donnent une coloration pourpre, sauf l'asparagine (coloration jaune-brun).

* **Réactif de KAWERAU :**

1 ml d'une solution saturée de nitrate de cuivre, avec 0,2 ml d'acide nitrique à 10 % (vol/vol) dilués dans un ballon à 100 ml par de l'éthanol.

Conservation d'un chromatogramme :

— On pulvérise sur le chromatogramme révélé à la ninhydrine le réactif de Kawerau. Les taches apparaissent en rouge sur un fond légèrement verdâtre.

b) Révélations spécifiques.

1° Réactif d'EHRlich (11).

1 % de para-diméthyl-amino-benzaldéhide dans HCl N après pulvérisation sur le chromatogramme. l'apparition d'une tache jaune indique la présence de citrulline (11).

2° Réactif Nitroprussiate et Cyanure de Sodium (12).

— Réactif 1 : on dissout 1,5 g de nitroprussiate de sodium dans 5 ml d'acide sulfurique 2 N. On ajoute 95 ml de méthanol et 10 ml d'ammoniaque à 28 %. La solution est filtrée et conservée à froid.

— Réactif 2 : on dissout 2 g de NaCN dans de l'eau et on dilue à 100 ml avec méthanol.

Pour le groupe *thiol* (la *Cystéine* par exemple), on utilise le réactif 1.

Pour le groupe *disulfure* (la *Cystine* par exemple), on trempe le chromatogramme dans le réactif 1. Quand la feuille est encore humide, on la trempe de nouveau dans le réactif 2. Une tache violette sur un fond jaune apparaît lorsqu'il existe un pont disulfure. La réaction est très sensible. Elle est positive et visible pour le *glutathion oxydé* jusqu'à 1 gamma, et pour la *Cystine* jusqu'à 2 ou 3 gamma.

3° Réactif à l'isatine.

0,2 % d'isatine dans le n-butanol contenant 4 % d'acide acétique (13). Dans l'obscurité, et à la température ordinaire, seules la *proline* et l'*hydroxyproline* sont colorées en bleu. A chaud les autres acides aminés sont également révélés (tryptophanne, etc...). On peut également utiliser un autre réactif à l'isatine : 0,2 % d'isatine dans l'acétone (14). Après pulvérisation, le chromatogramme est mis dans une étuve à 70° C saturée d'eau pendant 10 minutes.

La *proline*, l'*hydroxyproline*, l'*acide pipécolique*, sont colorés en bleu. Une légère réaction peut être donnée par la tyrosine et la phénylalanine.

4° Réactif de JEPSON et SMITH (15).

On sait qu'après pulvérisation d'un réactif à l'isatine (cité plus haut), et chauffage, la proline et l'hydroxyproline se révèlent en bleu. Si on pulvérise alors le réactif d'EHRlich (solution de paradiméthyl-aminobenzaldéhide à 1 % dans un mélange de 9 vol. d'acétone et d'un volume de HCl concentré), il apparaît une coloration rouge cerise intense, absolument *spécifique de l'hydroxyproline*. Elle est très sensible et elle permet de déceler 0,1 gamma/cm² d'hydroxyproline.

D. — Condition d'Hydrolyse.

L'hydrolyse est effectuée dans un tube scellé, en milieu HCl 5.6 N à 100° C pendant 24 heures.

Ces conditions hydrolysent la plupart des peptides, détruisent le tryptophane et transforment les amides des acides dicarboxyliques (asparagine, glutamine) en acides aminés dicarboxyliques (acide glutamique, acide aspartique).

E. — RESOLUTION DES PROBLEMES DELICATS D'IDENTIFICATION.

a) *Couplage Electrophorèse à pH 2,4 Chromatographie dans le système de Butanol-Acétique.*

1° CITRULLINE.

La citrulline occupe le même emplacement que la glutamine (fig. 1 et fig. 2). Sa présence peut être décelée par la coloration jaune obtenue en présence du réactif d'EHRlich. Après hydrolyse totale du milieu étudié, la glutamine disparaît. La persistance d'une tache à cet emplacement du chromatogramme est due à la présence de citrulline.

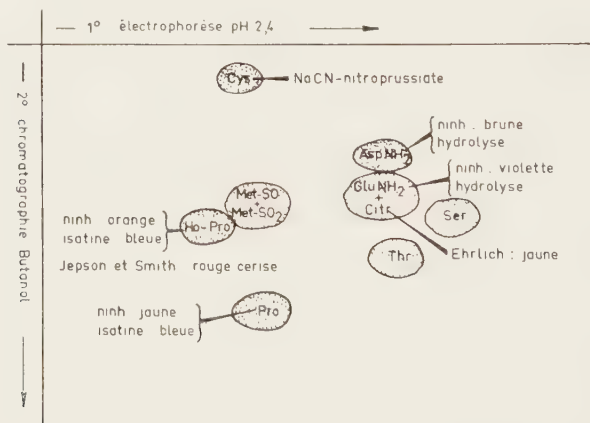


FIG. 1. — Localisation schématique de quelques « acides aminés neutres » dans le couplage bidimensionnel électrophorèse (pH 2,4) — chromatographie (dans le butanol).

Ser : sérine
Thr : thréonine
Pro : proline
HoPro : hydroxyproline
Asp-NH₂ : asparagine

Glu-NH₂ : glutamine
Cit : citrulline
Met-SO : méthionine-sulfoxyde
Met-SO₂ : méthionine-sulfone
Cys : cystine

Expt. - Ac-S-Su - G-Su + C¹⁴ - G-Su - Met-Su

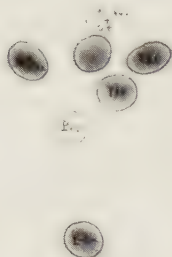


FIG. 2. — Couplage d'électrophorèse à pH 2,4 et de Chromatographie dans le butanol-acétique.

Ser : sérine
Thr : thréonine
Pro : proline
φ-Ala : phényl-alanine
Met-SO : méthionine-sulfoxyde
Cit : citrulline
Glu-NH₂ : glutamine

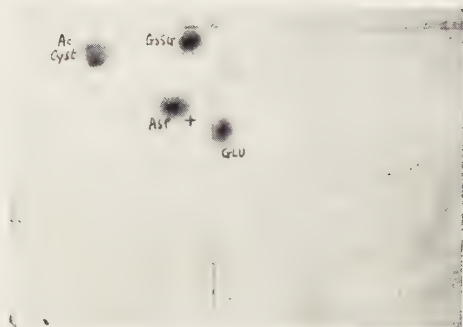


FIG. 3. — Couplage d'électrophorèse à pH 3,9 et de Chromatographie dans le butanol-acétique.

Ac. Cyst. : acide cystéique
Asp : acide aspartique
Glu. : acide glutamique
G-SS-G : glutathion oxydé

Une croix représente l'emplacement de G-SH.

2° CYSTINE.

Sur l'électrochromatogramme (pH 2,4-Butanol), on décèle la cystine (ou la cystéine) par le réactif nitro prussiate-NaCN (12). Mais sur le papier épais Whatman n° 3, cette réaction est plus difficile à réaliser.

Toutefois, sa position sur l'électrochromatogramme est facile à déterminer, étant donné que son R_F est très faible dans le système Butanol-Acide Acétique (fig. 1).

3° PROLINE.

Sa très grande sensibilité au réactif à l'isatine, même à la température ordinaire (13), rend sa localisation facile. D'autant plus qu'à la révélation à la ninhydrine, elle donne une coloration jaune caractéristique.

4° HYDROXYPROLINE.

Non seulement la coloration orangée qu'elle donne avec la ninhydrine est caractéristique, mais encore le réactif de JEPSON et SMITH est absolu-

ment spécifique pour sa localisation dans l'électrochromatogramme. Elle empiète très légèrement sur la méthionine sulfone ou la méthionine sulfoxyde (voir fig. 1).

5° ASPARAGINE.

Elle est caractérisée aussi bien par sa coloration à la ninhydrine (jaune-brun), que par sa disparition après l'hydrolyse.

b) *Couplage Electrophorèse à pH 3,9 et Chromatographie dans le système de Butanol-Acétique.*

Nous utilisons le couplage d'électrophorèse à pH 3,9 et de chromatographie dans le système Butanol-Acétique (Voir IDa). pour identifier les composés suivants :

1° GLUTATHION (fig. 3).

Le glutathion oxydé (GS-SG) et le glutathion réduit (G-SH), ont une migration électrophorétique qui se situe entre l'acide aspartique et l'acide glutamique (plus voisine de l'acide aspartique), mais le R_F de GS-SG dans le système de butanol-acétique est très faible (inférieur à celui de l'acide cystéique), tandis que celui du glutathion réduit G-SH est légèrement supérieur à celui de l'acide aspartique, mais inférieur à celui de l'acide glutamique (6).

La grande sensibilité du réactif nitroprussiate pour G-SH et du réactif nitroprussiate-NaCN pour GS-SG, permet une identification facile (12).

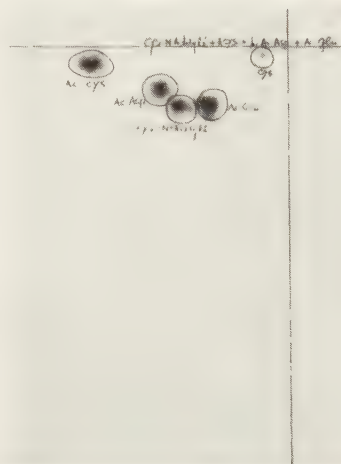


FIG. 4. — Couplage d'électrophorèse à pH 3,9 et de Chromatographie dans le butanol-acétique.

- Ac. Cys. : acide cystéique
- Ac. Asp. : acide aspartique
- Ac. Glu : acide glutamique
- Cys-N-Acétyle : Cystine-N-Acétyle
- Cys : Cystine

2° CYSTINE-N-ACÉTYLÉE (fig. 4).

Nous pouvons observer que la Cystine-N-Acétylée est située entre l'acide aspartique et l'acide glutamique, mais le R_F dans le système butanol-acétique est au moins égal à l'acide glutamique.

3° ACIDE N-ACÉTYL-ASPARTIQUE ET ACIDE N-ACÉTYL-GLUTAMIQUE.

Leur migration électrophorétique à pH 3,9 se situe entre l'acide cystéique et l'acide aspartique, mais leur R_F dans le système butanol-acétique est élevé (analogue à celui de la valine et de la leucine). Ils sont facilement repérés par la coloration jaune qu'ils donnent après pulvérisation de vert de bromocrésol à 0,9 % (p/v) dans l'éthanol à 95° ajusté à pH 4,5.

c) Séparation Leucine-Isoleucine.

La séparation de la leucine et de l'isoleucine ne peut être réalisée, si nous nous bornons aux techniques précédentes (chromatographie bidimensionnelle, couplages électrochromatographiques à divers pH décrits plus haut).

On peut la réaliser par une chromatographie bidimensionnelle qui utilise le système solvant de HOGSTROM (16), en deuxième dimension.

La première chromatographie est effectuée dans le système butanol-acétique (voir 1 B). La seconde dimension est effectuée avec le solvant de HOGSTROM (Méthyléthylcétone-Acétone-Eau) (3 : 1 : 0,6). Durée 20 à 24 heures.

F. — Chromatographie des Dérivés Dinitrophénylés.

On utilise le papier Whatman n° 1 (40 × 55 cm) (17).

La première dimension de la chromatographie est réalisée avec le système « toluène » de BISERTE, modifié par LÉVY, dont la composition est la suivante :

Toluène — Pyridine — Monochlorhydrine du Glycol — Ammoniaque 0,8 N (30 : 9 : 18 : 18).

Les dérivés dinitrophénylés en solution acétonique sont déposés à l'aide d'une micropipette dans le coin d'une feuille (intersection des deux lignes : 5 cm/40 et 10/55 cm).

La feuille de papier est roulée en forme de cylindre maintenu par des agrafes. Le rouleau est posé dans l'espace annulaire compris entre deux cristallisoirs, posés dans un récipient en verre (hauteur 46 cm, base de 23 × 23 cm). On place dans le cristallisoir central 200 ml d'ammoniaque

0.8 N. Après un temps d'équilibration de plusieurs heures (6 à 24 h), on verse 50 ml de la phase organique du solvant toluène dans l'espace annulaire, la chromatographie ascendante dure environ 15 heures.

Les feuilles sont enlevées et séchées par ventilation d'air tiède pendant 12 h à l'abri de la lumière.

La feuille est alors dépliée, retournée et placée dans une cuve en verre (dimensions : hauteur 48 cm, base 46 / 36 cm) pour une chromatographie descendante avec un système solvant constitué par un tampon phosphate 1,5 M de pH 6 ($\text{PO}_4 \text{H}_2\text{Na}$ 1M, $\text{PO}_4 \text{HNa}_2$ 0.5 M) (durée 15 heures).

DEUXIEME CHAPITRE

HISTORIQUE ET BUT DU TRAVAIL

Les renseignements fournis par la littérature sur la composition et le taux des acides aminés libres et totaux dans les liquides d'ascite sont relativement peu nombreux.

Une étude chromatographique des acides aminés libres dans les liquides d'ascite et pleuraux a été effectuée par ELLIS et Coll. (18) (6 liquides d'ascite, 4 liquides pleuraux). Ils ont mis en évidence la présence constante d'acide aspartique, d'acide glutamique, de sérine, de glycocolle, de proline, de méthionine et de leucine dans ces liquides; l'alanine, la glutamine, l'arginine, l'histidine et la tyrosine sont présents, mais de façon inconstante. Ils soulignent qu'il n'y a pas de variations qualitatives importantes dans la composition en acides aminés libres des transsudats et des exsudats. Ces auteurs ne trouvent pas non plus de différences significatives de la teneur en acides aminés de ces liquides d'ascite quelle que soit leur origine étiologique, cirrhotique ou néoplasique.

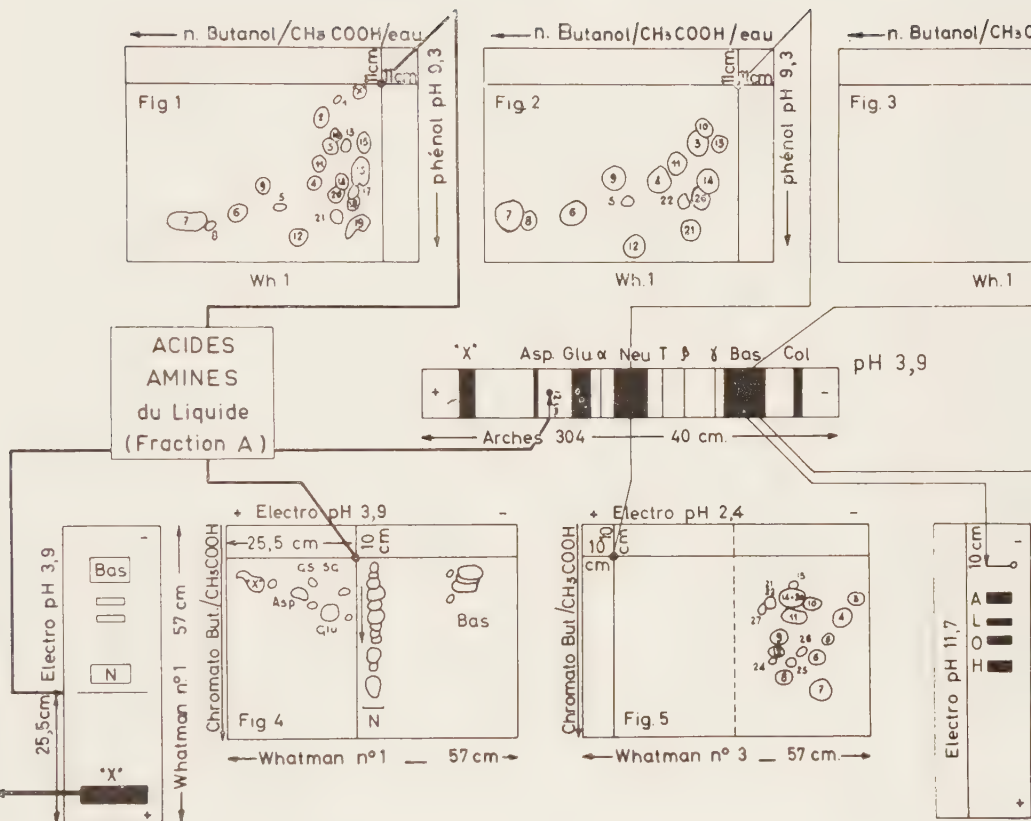
M. BOULANGÉ (19) a procédé à une étude qualitative simultanément sur le sérum et sur le liquide d'ascite de sujets atteints de cirrhose éthylique. Selon cet auteur, la distribution des acides aminés dans les liquides d'ascite reflète assez fidèlement les perturbations du sérum. Il note une diminution sensible des acides monoaminés dicarboxyliques (aspartique et glutamique), aussi bien dans le sérum que dans le liquide d'ascite. Une augmentation de la méthionine et de la tyrosine pourrait toutefois exister dans le liquide d'ascite cirrhotique par rapport au sérum.

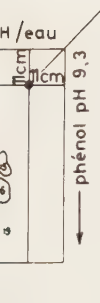
Récemment, KNAUFF et Coll. (20) ont publié un travail expérimental portant sur 23 liquides d'ascites et pleuraux, qu'ils ont étudiés qualitativement par un couplage électrophorèse-chromatographie sur papier, et quantitativement par une variante de la technique de MOORE et STEIN (21). Ces auteurs confirment eux aussi la similitude qualitative et quantitative de la composition en acides aminés libres des exsudats et des transsudats. Les taux des acides aminés libres trouvés par ces auteurs dans les liquides d'ascite sont comparables à ceux du plasma.

Notre travail expérimental concerne l'étude qualitative et quantitative des acides aminés libres et totaux des liquides d'ascite ainsi qu'un essai d'identification de certaines de leurs formes combinées.

Nous avons groupé les divers liquides ascitiques selon leur origine étiologique et nous avons tenté de dégager, si elles existent, les variations qualitatives et quantitatives affectant certains acides aminés selon l'origine du liquide d'ascite.

Nous avons pensé que la connaissance de ces variations ainsi que la comparaison de la composition en aminoacides du liquide d'ascite et du sérum permettrait d'aborder sous un jour nouveau le problème délicat que pose l'apparition d'un liquide d'ascite afin d'en comprendre la physiopathologie.





LEGENDE DE LA FIG. 5

Les lignes en traits épais conduisent aux séparations qui ont été effectuées directement à partir de la fraction « A ».

Les lignes en traits fins conduisent aux couplages de méthodes qui sont réalisées à partir des éluats des fractions préalablement séparées par une électrophorèse à pH 3,9.

Les schémas 1, 2 et 3 de la figure représentent des chromatogrammes bidimensionnels : butanol-acétique en première dimension et phénol à pH 9,3 en deuxième dimension, effectuées dans les conditions décrites en IB.

Les schémas 4 et 5 représentent des couplages électrophorèse et chromatographie effectués dans les conditions décrites en IDa et IDb. Ces électrophorèses à pH 3,9 - 11,7 et 6,5 sont réalisées selon les conditions décrites en ICa, ICb et ICc.

1 : Ac. Aspartique, 2 : Ac. Glutamique, 3 : Glycine, 4 : Alanine, 5 : Ac. Alpha-amino-butyrique, 6 : Valine, 7 : Leucine et Isoleucine, 8 : Phénylalanine, 9 : Tyrosine, 10 : Sérine, 11 : Thréonine, 12 : Proline, 13 : Asparagine, 14 : Glutamine, 15 : Ornithine, 16 : Lysine, 17 : Histidine, 18 : Arginine, 19 : Méthylhistidine, 20 : Citrulline, 21 : Méthionine sulfoxyde, 22 : Méthionine sulfone, (23 : Cystine), 24 : Tryptophane, 25 : Méthionine, 26 : Ac. pipécolique, 27 : Hydroxyproline, (28 : Sarcosine).

Abréviations :

A = 18 : Arginine H = 17 : Histidine, L = 16 : Lysine, O = 15 : Ornithine, MH = 19 : Méthylhistidine, G-SS-G : glutathion oxydé, α : Ac. Alpha-amino-adipique, β : beta-alanine, T : Ac. beta-amino-isobutyrique ou T-Spot, γ : Ac. gamma-amino-butyrique, Col : Colamine.

Erratum :

Dans le schéma 5 de la figure 5, (électrophorèse à pH 2,4 - chromatographie butanol-acétique), le N° 9 indique la proline et le N° 12 est la tyrosine.



TROISIEME CHAPITRE

ETUDES QUALITATIVES SUR LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La chromatographie de partage sur papier, utilisée dans l'étude des aminoacides des liquides biologiques est avant tout un procédé qualitatif qui permet d'étudier les variations importantes.

Son application aux liquides d'ascite nécessite quelques précautions préalables ainsi que nous l'avons vu dans le premier chapitre, notamment la déminéralisation et l'élimination de substances chromatographiquement gênantes. L'utilisation de résines échangeuses d'ions s'est révélée particulièrement efficace à cet égard : elle présente l'avantage de permettre simultanément la déminéralisation du milieu et un fractionnement de base qui facilite grandement l'obtention des composantes amino-acide et peptidique.

Dans le but d'aborder utilement l'étude quantitative des acides aminés des liquides d'ascite, nous avons utilisé des techniques séparatrices qui associent à la chromatographie de partage sur papier d'autres procédés de fractionnement dont les avantages se superposent et complètent la séparation chromatographique, comme les méthodes réalisant le couplage des techniques de chromatographie et d'électrophorèse sur papier, particulièrement efficaces pour obtenir une séparation complète des amino-acides et de leurs formes combinées.

Notre expérimentation qualitative a porté au total sur 27 liquides d'ascite d'origine diverse : 12 liquides d'ascite prélevés chez des sujets présentant une cirrhose d'origine éthylique, 7 liquides d'ascite cardiaque, 5 liquides d'ascite cancéreuse confirmée, un liquide d'ascite tuberculeuse et 2 prélevés chez des sujets cirrhotiques non éthyliques.

Chaque liquide d'ascite a été étudié séparément, la détermination qualitative étant réalisée selon le protocole proposé par G. BISERTE et Coll. (1).

Le plan général de séparation est représenté sur la figure 5.

A. — Préparation de la Composante « Aminoacide ».

La préparation préliminaire des liquides d'ascite qui doit assurer leur détermination et leur fractionnement de base est réalisée par passage sur une résine à échange de cation. (Voir le chapitre I, paragraphe A, soit par abréviation IA.)

L'éluat (fraction A), qui contient la fraction « aminoacide » à l'exception de la taurine est alors concentré à sec par ventilation d'air froid. Le résidu est repris par 5 ml (*) d'une solution d'alcool isopropylique à 10 % dans l'eau distillée (vol/vol); cette solution conservée à la température de 4° C. est l'objet de toute une série de séparations électrophorétiques et chromatographiques qui assurent une résolution satisfaisante des acides aminés libres. Une partie de cette fraction A est soumise à l'hydro-

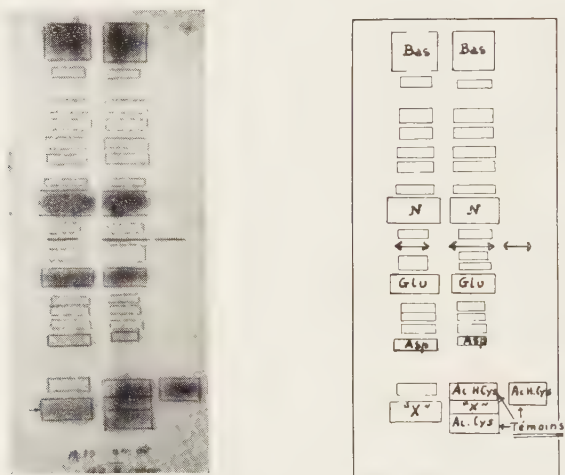


FIG. 6. — Electrophorèse à pH 3,9 de la fraction « aminoacides » d'un liquide d'ascite (avant hydrolyse).

Tampon : pyridine-acide acétique-eau (30 : 100 : 4 870).

Cuve en V renversé (type DURRUM), entièrement en chlorure de polyvinyle pouvant recevoir une feuille de 57 cm de longueur.

Papier WHATMAN N° 1.

Durée : 15 heures sous 380 volts.

Point de départ : 25 cm du côté anodique (les flèches figurent les points de dépôt).

Asp : acide aspartique ; Glu : acide glutamique ; N : « acides aminés neutres » ; Bas : « acides aminés basiques » ; « X » : composé X.

Témoins : Ac. Cys : acide cystéique ; Ac. H. Cys : acide homocystéique.

* Pour un volume initial de 200 ml de liquide d'ascite.

lyse totale, ce qui nous permet d'explorer également les acides aminés totaux du liquide d'ascite.

B. - *Electrophorèse à pH 3.9* (voir figure 6, technique décrite dans ICa).

Ce temps électrophorétique sert à la fois d'essai de concentration de la solution à analyser et de séparation de groupe des acides aminés et de leurs formes combinées. Il permet notamment l'isolement de l'ensemble des acides aminés « Neutres » et des « Basiques », ainsi que la séparation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique.

Après révélation à la ninhydrine, on peut facilement identifier un certain nombre de bandes qui correspondent principalement à l'acide aspartique, à l'acide glutamique, au groupe des acides aminés « Neutres », à celui des acides aminés « Basiques » et à la colamine. Cette première électrophorèse permet également de déceler la présence d'un certain nombre

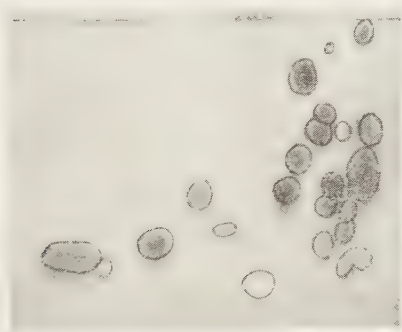


FIG. 7. — Chromatographie bidimensionnelle de la fraction « aminoacides » d'un liquide d'ascite (**avant hydrolyse**).

Chromatographie dans le système butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) en première dimension (flèche 1) et dans le phénol saturé avec un tampon borate de pH 9,3 (acide borique 0,1 N : 200 ml ; soude 0,1 N : 113,5 ml) en seconde dimension (flèche 2). Papier WHATMAN N° 1 (46 X 57 cm).

A gauche : photographie directe, à droite : représentation schématique.

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 1 : acide aspartique | 12 : proline |
| 2 : acide glutamique | 13 : asparagine |
| 3 : glycolle | 14 : glutamine |
| 4 : alanine | 15 : ornithine |
| 5 : ac. alpha-aminobutyrique | 16 : lysine |
| 6 : valine | 17 : histidine |
| 7 : leucines | 18 : arginine |
| 8 : phénylalanine | 19 : méthyl-histidine |
| 9 : tyrosine | 20 : citrulline |
| 10 : sérine | 21 : méthionine-sulfoxyde |
| 11 : thréonine | |

de bandes ninhydrine positives qui correspondent à des peptides et à diverses formes combinées d'acides aminés et qui disparaissent après l'hydrolyse.

C. — Chromatographie bidimensionnelle de la fraction A.

(Technique décrite dans 1 B).

a) Avant hydrolyse.

Cette chromatographie pratiquée sur la fraction A des liquides d'ascite avant hydrolyse donne un aperçu général de la composition des liquides d'ascite en acides aminés libres et de leurs formes combinées.

Parmi les acides aminés neutres, on peut déceler (fig. 7) du glycocolle, de l'alanine, de la valine, de la leucine (et de l'isoleucine), de la proline et de la phénylalanine en quantités importantes, de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine en quantités relativement modérées et de l'acide alpha-aminobutyrique à l'état de traces.

Parmi les acides aminés basiques, qui sont difficilement identifiables par cette seule chromatographie bidimensionnelle, on peut toutefois distinguer des quantités élevées de lysine et affirmer la présence d'ornithine.

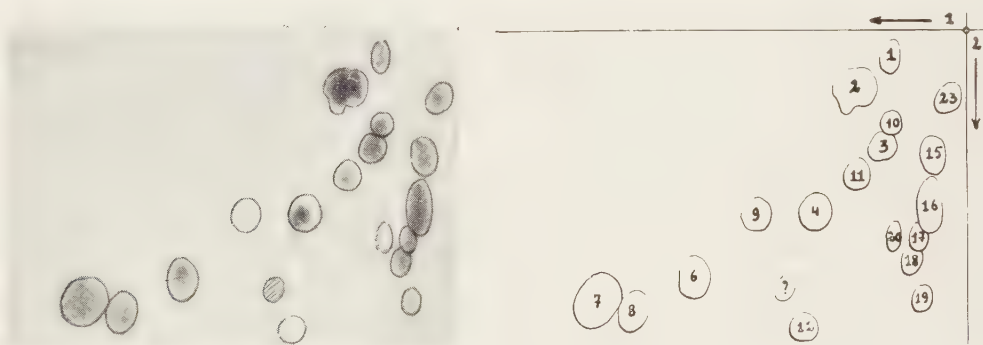


FIG. 8. — Chromatographie bidimensionnelle des acides aminés d'un liquide d'ascite (après hydrolyse).

Conditions expérimentales identiques à celles décrites pour la FIG. 7.

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1 : acide aspartique | 11 : thréonine |
| 2 : acide glutamique | 12 : proline |
| 3 : glycocolle | 15 : ornithine |
| 4 : alanine | 16 : lysine |
| 6 : valine | 17 : histidine |
| 7 : leucines | 18 : arginine |
| 8 : phénylalanine | 19 : méthyl-histidine |
| 9 : tyrosine | 20 : citrulline |
| 10 : sérine | 23 : cystine |

d'histidine, et d'arginine: la méthylhistidine existe selon les cas envisagés à une concentration variable.

Deux taches ninhydrine positives de cette chromatographie bidimensionnelle correspondent respectivement à l'asparagine et à la glutamine.

Il existe également un composé inconnu (tache X), dont l'emplacement est voisin de celui de l'acide cystéique et à propos duquel nous reviendrons dans un chapitre particulier (voir également fig. 6 et fig. 7).

b) *Après hydrolyse.*

La chromatographie de la fraction A hydrolysée permet de déceler la présence des taches ninhydrine positives moins nombreuses du fait de la disparition de certaines formes combinées des acides aminés (asparagine et glutamine) et de peptides (fig. 8).

On peut remarquer l'augmentation assez considérable de l'acide aspartique et surtout de l'acide glutamique, augmentation qui correspond à l'hydrolyse de diverses formes combinées de ces deux aminoacides dicarboxyliques.

Après hydrolyse totale, le composé inconnu (tache X), diminue nettement d'intensité. Par contre, l'hydrolyse totale fait apparaître une tache qui correspond à la cystine. Par ailleurs, un certain nombre de taches ninhydrine positives qui persistent après hydrolyse totale, ne sont pas toutes identifiables avec certitude par une simple chromatographie bidimensionnelle.

Désirant, dans un but qualitatif d'abord, et quantitatif secondairement, obtenir la résolution parfaite et l'identification certaine des acides aminés des liquides d'ascite, nous avons été amenés à utiliser le plan de fractionnement décrit dans le chapitre I. Chacun des groupes obtenus par électrophorèse à pH 3,9 est repris pour une étude particulière puis soumis à d'autres techniques de séparation, soit en chromatographie bidimensionnelle, soit en électrophorèse dans divers tampons, soit encore en un couplage bidimensionnel électrophorèse-chromatographie (voir plan général et fig. 5).

D. — *Etude de la zone des « Neutres » préalablement séparés par électrophorèse à pH 3,9.*

La zone des « aminoacides » à comportement neutre à pH 3,9 récupérés par élution est passée en chromatographie bidimensionnelle et soumise soit à une chromatographie bidimensionnelle, soit à un couplage bidimensionnel électrophorèse-chromatographie.

a) Chromatographie bidimensionnelle des « Neutres ».

Selon la technique décrite en Ib, cette chromatographie bidimensionnelle permet une bonne séparation des acides aminés « Neutres », leur identification est rendue d'autant plus aisée que l'isolement des composés « Neutres » à pH 3,9 a permis de se débarrasser notamment des aminoacides dicarboxyliques et basiques, et éventuellement des ω -aminoacides (beta-alanine, acide beta-amino-isobutyrique ou T-Spot, acide gamma-aminobutyrique, acide δ -aminovalérique) et des amines biogènes.

Le glycocolle, l'alanine, la valine, les leucines, et la proline y sont nettement prédominantes, la sérine, la thréonine et la phényl-alanine y sont abondantes, la tyrosine, l'acide alpha-aminobutyrique sont également présents, mais en quantités relativement modérées (fig. 9).

Dans l'hydrolysât total de la fraction A d'un liquide d'ascite, la chromatographie bidimensionnelle des « Neutres » montre l'apparition d'un peu de sarcosine et la disparition de l'asparagine et de la glutamine.

Quelques difficultés d'identification subsistent cependant dans cette zone des composés « Neutres ». Nous avons utilisé des témoins internes,

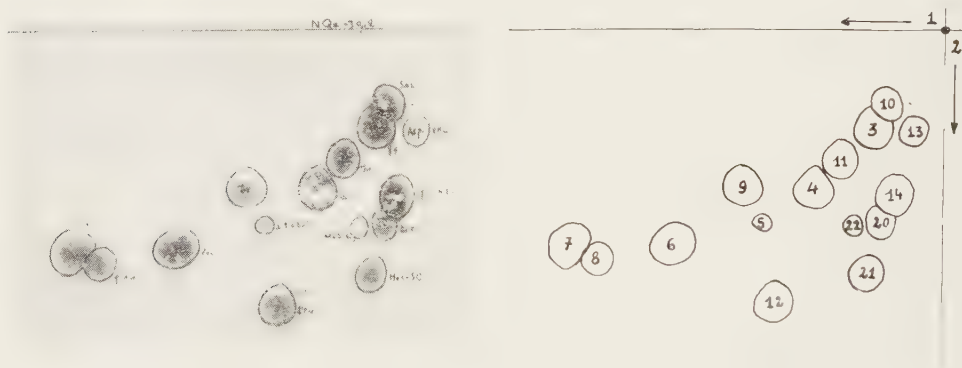


FIG. 9. — Chromatographie bidimensionnelle des « acides aminés neutres » d'un liquide d'ascite (**avant hydrolyse**).

Conditions expérimentales identiques à celles décrites pour la FIG. 7.

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 3 : glycocolle | 11 : thréonine |
| 4 : alanine | 12 : proline |
| 5 : ac. alpha-aminobutyrique | 13 : asparagine |
| 6 : valine | 14 : glutamine |
| 7 : leucines | 20 : citrulline |
| 8 : phénylalanine | 21 : méthionine-sulfoxyde |
| 9 : tyrosine | 22 : méthionine-sulfone |
| 10 : sérine | |

externes et des révélations spécifiques (voir IIB et IIC). pour résoudre ces problèmes.

1° *La Cystine.*

Elle est assez difficile à identifier avec certitude sur les chromatogrammes, car elle a tendance à « traîner ».

— la présence de la cystine libre dans quelques cas (sur 27), a été décelée en très faible quantité, grâce à l'emploi de témoins internes de cystine.

— la réaction au nitroprussiate- NaCN nous a également permis de vérifier l'existence à l'état de traces de cystine libre dans les liquides d'ascite: mais cette réaction, caractéristique des groupements disulfures, n'est pas spécifique de la cystine.

— aussi, avons-nous réalisé l'identification certaine de la cystine sur les fractions « A » des liquides d'ascite, en la transformant en acide cystéique: en traitant les composés « Neutres » de la fraction A, séparés préalablement par électrophorèse à pH 3,9 (voir technique ICa), par de l'acide performique (22) *, la cystine se transforme en acide cystéique facile à mettre en évidence par une simple électrophorèse à pH 3,9 (voir fig. 6).

Il suffit donc d'effectuer une électrophorèse comparative des composés « Neutres » de la fraction A, avant et après oxydation en présence des témoins latéraux (Ac. Aspartique, Ac. Glutamique, Ac. Cystéique; Neutre).

2° *La Méthionine.*

Deux taches ninhydrine positives persistent après hydrolyse totale et correspondent à la méthionine sulfone et méthionine sulfoxyde (fig. 9). La localisation de ces deux dérivés de la méthionine a pu être précisée, là encore, grâce à l'emploi de témoins internes et témoins latéraux.

La présence indiscutable de ces deux dérivés d'oxydation de la méthionine semble toutefois assez insolite dans les liquides biologiques (sérum, liquide d'ascite, liquide pleural...). En fait, ils se forment aux dépens de la méthionine au cours des différentes étapes de préparation de ces liquides. (Voir Quantitative VI Ab1).

* Préparation de l'acide performique :

On mélange 1 ml d'acide formique pur, avec 9 ml d'eau oxygénée à 110 vol. pendant 2 h. à 20° C. Les composés « Neutres », élués, séchés, sont repris par 0,5 ml d'eau. On y ajoute 10 ml d'acide performique; après 2 h., on verse 30 à 40 ml d'eau et on ventile jusqu'à siccité. On reprend par l'eau distillée et on évapore. Cette opération est réalisée plusieurs fois de suite.

3° La Citrulline.

L'identification de la citrulline est souvent difficile sur les chromatogrammes bidimensionnels, et peut être encore plus malaisée sur les électrochromatogrammes, du fait du voisinage immédiat d'un certain nombre de taches (glutamine, méthionine-sulfone et éventuellement hydroxyproline). Aussi, avons-nous effectué une révélation spécifique de la citrulline dans cette région du chromatogramme. La réaction d'EHRlich au para-diméthyl-amino-benzaldéhyde (11) a fait apparaître, à l'endroit présumé, une tache jaune caractéristique de la citrulline.

La chromatographie bidimensionnelle des « Amino acides à comportement neutre », permet donc d'apporter des réponses intéressantes à un

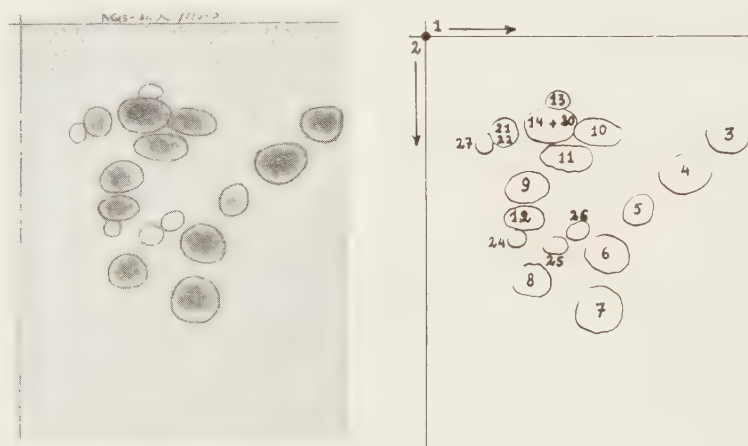


FIG. 10. — Couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 2,4 et chromatographie butanol-acétique des « acides aminés neutres » d'un liquide d'ascite (avant hydrolyse).

— **Première dimension** : électrophorèse dans le sens de la plus grande dimension (57 cm) d'une feuille de papier WHATMAN N° 3 dans un appareil de type DURRUM (380 volts, 20 heures) ; le point de dépôt se trouve à 10 cm du bord de la feuille du côté anodique.

— **Deuxième dimension** : chromatographie unidimensionnelle dans le butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) pendant 24 heures.

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 3 : glycocolle | 13 : asparagine |
| 4 : alanine | 14 : glutamine |
| 5 : ac. alpha-aminobutyrique | 20 : citrulline |
| 6 : valine | 21 : méthionine-sulfoxyde |
| 7 : leucines | 22 : méthionine-sulfone |
| 8 : phénylalanine | 24 : tryptophanne |
| 9 : proline | 25 : méthionine |
| 10 : sérine | 26 : acide pipécolique |
| 11 : thréonine | 27 : hydroxyproline |
| 12 : tyrosine | |

certain nombre de problèmes (surtout pour l'identification séparée de la méthionine sulfone et de la méthionine sulfoxyde, de la citrulline et de la glutamine, de l'asparagine et de la glutamine). Toutefois, cette technique ne permet pas une résolution suffisante du tryptophane, de la méthionine et de la valine, de la sérine et du glycolle, de la phénylalanine et des leucines.

La séparation de ces « Amino acides Neutres » est obtenue par un couplage bidimensionnel électrophorèse-chromatographie.

b) *Couplage bidimensionnel électrophorèse-chromatographie*
(Voir IDb).

Le couplage électrophorèse à pH 2,4 — chromatographie dans le butanol nous a permis de vérifier les résultats acquis par la chromatographie bidimensionnelle des « Neutres » (fig. 10) (fig. 11).

Cette technique de couplage nous a notamment montré la présence dans les liquides d'ascite, en quantités relativement modérées de tryptophane et de méthionine à l'état de traces. Il a été également possible par cette

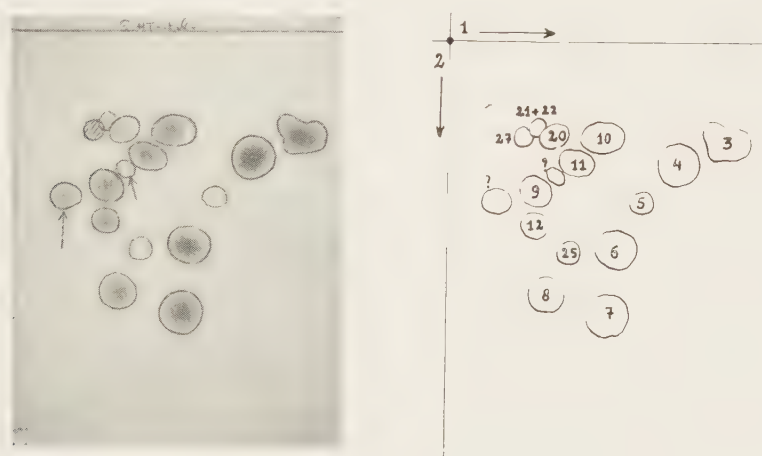


FIG. 11. Couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 2,4 - chromatographie butanol-acétique des acides aminés « neutres » d'un liquide d'ascite (après hydrolyse totale).

Conditions expérimentales identiques à celles décrites pour la fig. 10.

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 3 : glycolle | 11 : thréonine |
| 4 : alanine | 12 : tyrosine |
| 5 : ac. alpha-aminobutyrique | 20 : citrulline |
| 6 : valine | 21 : méthionine-sulfoxyde |
| 7 : leucines | 22 : méthionine-sulfone |
| 8 : phénylalanine | 25 : méthionine |
| 9 : proline | 27 : hydroxyproline |
| 10 : sérine | |

technique d'affirmer la présence, à l'état de traces, d'hydroxyproline par la révélation de JEPSON-SMITH (15) (voir II Cb4) et de vérifier la présence de glutamine et de citrulline qui demeurent pratiquement confondues après ce couplage; mais il est toutefois possible de s'assurer de leur présence séparée par la réaction d'EHRLICH pour la citrulline, et par la disparition de la glutamine au cours de l'hydrolyse totale.

c) Séparation leucine-isoleucine.

Le seul problème qui ne soit pas résolu est celui de la séparation leucine-isoleucine; mais celle-ci peut être facilement obtenue par l'utilisation du système-solvant de HOGSTROM (16) : on peut la réaliser sur l'éluat des « Neutres », soit en chromatographie unidimensionnelle descendante pendant 30 h, soit en couplage bidimensionnel-électrophorèse à pH 2.4 et chromatographie dans le système de HOGSTROM. On peut également séparer la leucine et l'isoleucine par une chromatographie bidimensionnelle directe de la fraction A. Les R_F calculés par rapport à celui du tryptophane sont les suivants :

— isoleucine : R_F (Try) 0.78.

— leucine : R_F (Try) 0.86.



FIG. 12. — Chromatographie bidimensionnelle des « acides aminés basiques » d'un liquide d'ascite (avant hydrolyse).

Conditions expérimentales identiques à celles décrites pour la FIG. 11.

- 15 : ornithine
- 16 : lysine
- 17 : histidine
- 18 : arginine
- 19 : méthyl-histidine

E. — Etude de la zone des Composés « Basiques ».

a) Chromatographie bidimensionnelle.

On peut ainsi étudier dans le système butanol-acétique et phénol tamponné à pH 9.3 l'éluat des aminoacides « Basiques » de la fraction A. avant et après l'hydrolyse totale.

Avant l'hydrolyse, la chromatographie bidimensionnelle montre la présence dans les liquides d'ascite des 4 amino-acides suivants : ornithine, lysine, histidine, et arginine, avec toutefois prédominance de la lysine (fig. 12). Dans certains liquides d'ascite, la méthyl-histidine est présente, mais seulement en faible quantité.

Cependant, cette région des « Basiques » est souvent difficile à interpréter par une simple chromatographie bidimensionnelle. En effet, dans les milieux biologiques, cette zone des « Basiques » peut contenir, outre les acides aminés sus-cités, de la glucosamine, de la tyramine et des peptides à caractère basique, tels que la carnosine et l'ansérine: elle peut comporter éventuellement de l'acide gamma-amino-butyrique provenant d'une récupération trop large de la bande des acides aminés basiques séparés en électrophorèse à pH 3.9 (voir fig. 5). Toutefois, la présence éventuelle de la glucosamine et de la tyramine peut généralement être déterminée par la chromatographie bidimensionnelle.

b) Electrophorèse à pH 11,7.

La séparation de l'ornithine, de la lysine, de l'histidine et de l'arginine est obtenue par électrophorèse dans une solution d'ammoniaque N (pH 11,7) (Technique décrite en I Cb).

La lysine est, de loin, l'acide aminé basique le plus abondant dans les liquides d'ascite: viennent ensuite, mais en quantité relativement plus faible, l'histidine et l'arginine. L'ornithine n'est présente qu'à une concentration faible et variable (fig. 13). Signalons que sur l'électrophorégramme ainsi obtenu, la glucosamine peut empiéter sur l'arginine, la tyramine sur la lysine, et que l'acide gamma-amino-butyrique peut légèrement chevaucher sur l'histidine et la méthylhistidine.

c) Electrophorèse à pH 6,5.

Le problème de la séparation de l'histidine et de la méthylhistidine peut être résolu par une électrophorèse pratiquée en tampon volatil de pH 6,5 (Technique décrite en I Cc).

Dans ces conditions, la séparation de l'histidine et de la méthylhistidine est satisfaisante. Elle peut donc s'appliquer utilement à l'identification et au dosage de ces deux acides aminés, surtout dans les hydrolysats totaux.

Mais nous n'avons trouvé de la méthylhistidine que dans quelques liquides d'ascite et en très faible quantité.

F. — Acides aminés à comportement acide.

a) *Electrophorèse à pH 3,9.*

L'électrophorèse des liquides d'ascite à pH 3,9 montre la présence dans la zone des « acides aminés à comportement acide » de 2 acides dicarboxyliques : l'acide aspartique et surtout l'acide glutamique. Par ailleurs, on peut noter l'absence d'acide cystéique dans les liquides d'ascite (fig. 6).

En outre, d'assez nombreuses bandes ninhydrine positives viennent se localiser, après électrophorèse à pH 3,9 dans la zone « acide » et s'échelonnent de l'acide cystéique jusqu'aux « Neutres ». Une de ces bandes, de migration électrophorétique intermédiaire entre celle de l'acide cystéique et celle de l'acide homocystéique, est particulièrement intense (composé « X »).



FIG. 13. — Electrophorèse à pH 11,7 des « acides aminés basiques » d'un liquide d'ascite (à deux concentrations différentes).

Tampon de pH 11,7 : $\text{NH}_4 \text{OH} \text{ N}$

Cuve en V renversé (type DURRUM) de grande dimension.

Papier WHATMAN N° 1.

Durée : 15 heures sous 380 volts.

Point de départ à 10 cm. du bord cathodique de la feuille (les flèches figurent les points de dépôt).

15 : ornithine

16 : lysine

17 : histidine

18 : arginine

Ces diverses bandes correspondent toutes à des formes combinées d'acides aminés puisque l'électrophorèse à pH 3,9 de l'hydrolysats total de la fraction A montre la présence exclusive d'acide aspartique et d'acide glutamique (fig. 6).

b) *Couplage bidimensionnel : électrophorèse à pH 3,9 suivie d'une chromatographie dans le butanol-acétique.*
(Technique décrite en IDa).

Il montre bien la présence de ces formes combinées à caractère acide et confirme l'hétérogénéité de cette zone (fig. 14).

L'éluat de la zone acide, comprise entre l'acide aspartique et l'extrémité anodique de l'électrophorégramme effectué à pH 3,9, libère en effet, après hydrolyse, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique en quantité très importante. Cette région « acide » comporte donc la présence d'un certain nombre de formes combinées de ces aminoacides. Ces composés hydrolysables, dont certains sont ninhydrine positifs, posent de délicats problèmes d'identification.

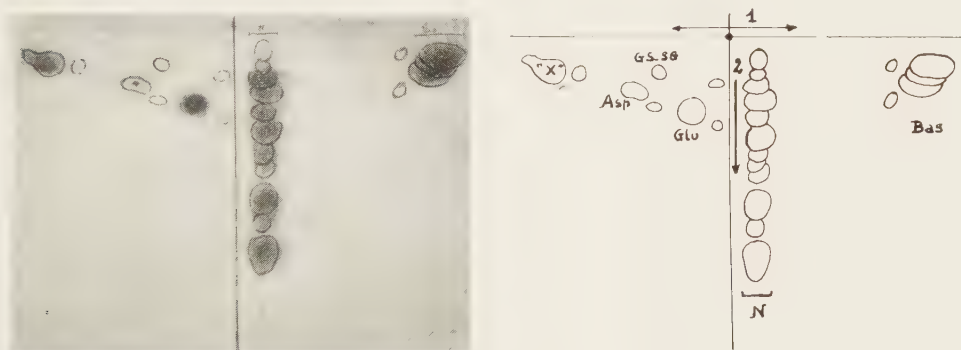


FIG. 14. — Couplage bidimensionnel électrophorèse à pH 3,9 — chromatographie dans le butanol-acétique de la fraction « aminoacides » d'un liquide d'ascite (avant hydrolyse).

— **Première dimension** : électrophorèse à pH 3,9 (pyridine-acide acétique-eau) (30 : 100 : 4870) sur une feuille de papier WHATMAN N° 1 (57×46 cm) dans une cuve de type DURRUM de grande dimension ; 380 volts, 15 heures) ; le point de dépôt, point noir sur le schéma de droite se trouve à 25,5 cm du bord anodique de la feuille.

— **Deuxième dimension** : chromatographie unidimensionnelle dans le système butanol-acétique-eau (4 : 1 : 5) pendant 24 heures.

Asp : acide aspartique
Glu : acide glutamique
N : « acides aminés neutres »
Bas : « acides aminés basiques »
GS-SG : glutathion oxydé (disulfure)
« X » : composé X

Pour les résoudre, nous avons d'abord précisé la localisation de quelques composés acides décelables dans les milieux biologiques :

— l'électrophorèse pratiquée à pH 3,9 en présence de témoins internes et latéraux, montre qu'aucune de ces bandes ne correspond à l'acide cystéique ni à l'acide homocystéique (fig. 6).

— l'acide alpha-aminoadipique est absent ou tout au plus à l'état de traces, ainsi que le montre le couplage bidimensionnel.

— le glutathion sous sa forme oxydée (disulfure) est mis en évidence, avant hydrolyse, dans le liquide d'ascite, tant par électrophorèse à pH 3,9 que par le couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 3,9 — chromatographie butanol). Les liquides ne renferment que très peu de glutathion sous forme réduite (thiol). De toute façon, nous avons vérifié que le glutathion trouvé dans les liquides d'ascite ne peut en aucun cas rendre compte à lui seul de la quantité considérable d'acide glutamique libéré par hydrolyse de l'éluat de cette zone acide.

— Par contre, les dérivés N-Acylés (N-Acétyle et N-Formyle) de l'acide aspartique et de l'acide glutamique se trouvent dans cette zone. Ils sont ninhydrine négatifs ou faiblement positifs, mais peuvent être mis en évidence grâce à leur caractère acide en utilisant un réactif au vert de bromocrésol. Le comportement de ces dérivés est également voisin de celui de l'acide pyroglutamique. Il est possible que l'augmentation de l'acide glutamique après l'hydrolyse totale provienne en partie de ces dérivés.

— Un seul problème, très important, n'est pas résolu : c'est celui qui concerne la tache « X » (fig. 6 et fig. 14) décelée en quantité importante en électrophorèse à pH 3,9 avant hydrolyse (migration électrophorétique comprise entre l'acide cystéique et l'acide homocystéique) et retrouvée lors du couplage électrophorèse à pH 3,9-chromatographie dans le butanol (fig. 14).

Ce problème est abordé dans un chapitre spécial (chapitre IV).

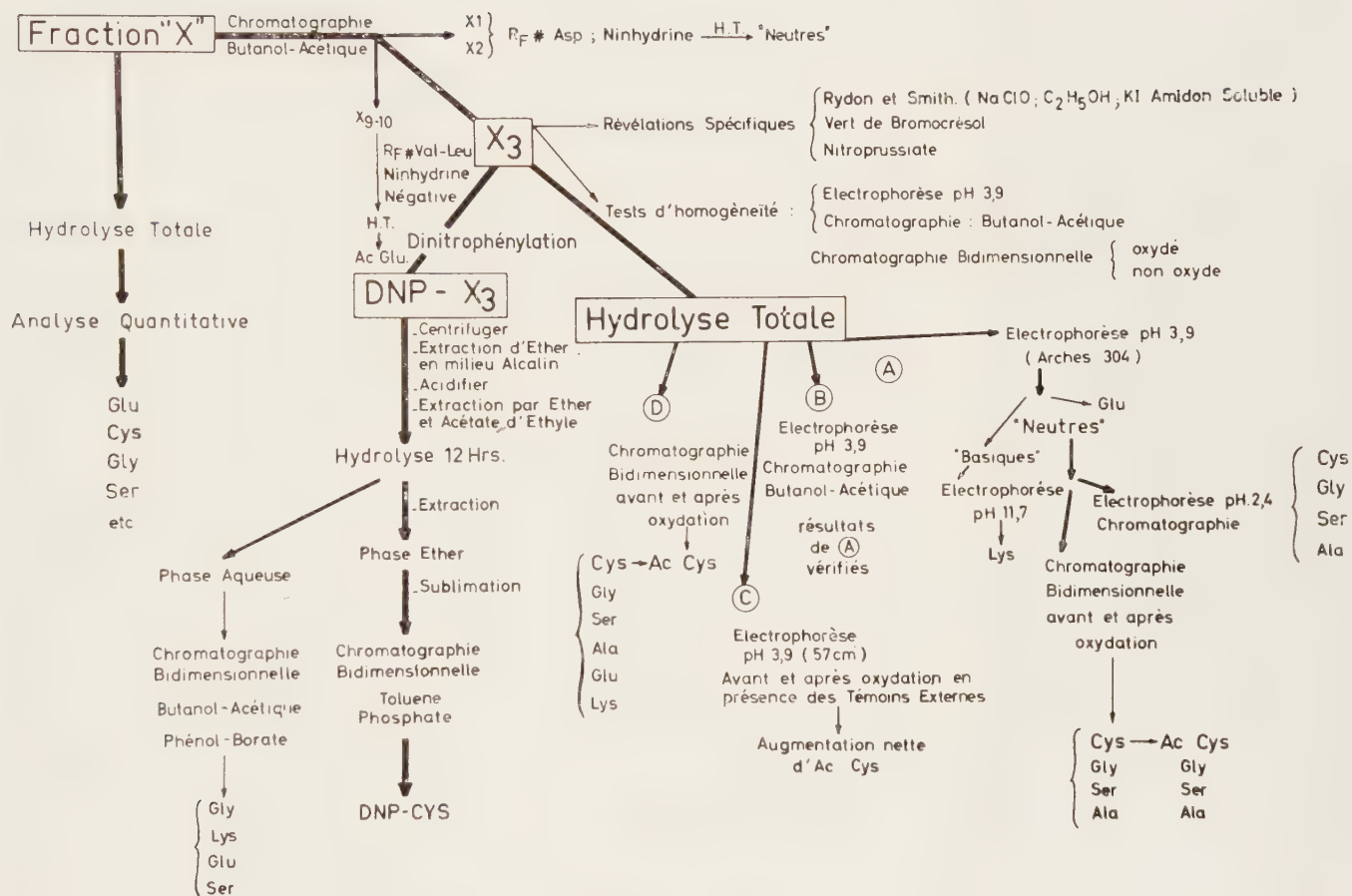


FIG. 15. Plan indiquant les diverses étapes de l'identification de la fraction « X ».

QUATRIEME CHAPITRE

IDENTIFICATION DE LA FRACTION « X ».

Nous avons signalé, dans le troisième chapitre, l'existence d'une tache ninhydrine positive : composé « X » qui se situe dans la zone de l'acide cystéique aussi bien en chromatographie bidimensionnelle que sur le couplage électro-chromatographique (électrophorèse à pH 3,9 et chromatographie dans le butanol acétique) (fig. 6, fig. 7 et fig. 14).

En électrophorèse à pH 3,9, on trouve que ce composé « X » possède une migration électrophorétique comprise entre l'acide cystéique et l'acide homocystéique (fig. 6).

Devant ce problème complexe, mais particulièrement important (la tache est très intense après la révélation à la ninhydrine), nous avons entrepris une étude détaillée de ce dérivé.

Pour éviter l'interférence des autres acides aminés lors de nos études, une séparation préparative électrophorétique est d'abord pratiquée (20 électrophorèses de 200 μ l chacune) (voir « études particulières » dans la figure 5). La figure 15 rassemble les diverses étapes de nos études.

A. — *Séparation de la fraction « X » par électrophorèse à pH 3,9 à partir de la fraction « A ».*

La bande du composé « X » est localisée grâce à l'emploi des témoins externes (2 dépôts au niveau de la ligne de départ de 10 μ l d'une solution dans 5 ml de la fraction « A » qui correspond en fait à 200 ml du liquide d'ascite), puis découpée et éluée par l'eau. Après évaporation, l'éluat est repris par une quantité d'alcool isopropylique à 10 %, égale à celle du volume initial (soit 4 ml).

B. — *Hydrolyse totale de la fraction « X » et Analyse quantitative de l'hydrolysât.*

On prélève un quart de l'éluat pour une hydrolyse totale et on pratique ensuite une analyse quantitative (voir tableau n° 12, dans le chapitre VI, paragraphe D).

Ascite n° 10. Fraction « X » hydrolysée.

Acide glutamique	1,23 mg/100 ml
Cystine	0,25 mg/100 ml
Glycocolle	0,07 mg/100 ml
Sérine	0,03 mg/100 ml
Leucine	0,02 mg/100 ml
Valine	0,01 mg/100 ml
Thréonine	0,01 mg/100 ml

Les acides aminés les plus importants sont donc l'acide glutamique et la cystine, on trouve ensuite le glycocolle. Les autres acides aminés n'existent qu'à l'état de traces.

C. — *Deuxième séparation de la fraction « X » par chromatographie unidimensionnelle.*

L'éluat de la fraction « X » est ensuite soumis à une deuxième série de séparations chromatographiques unidimensionnelles (10 ou 20 chromatogrammes) dans le système butanol-acétique en présence de témoins externes. (Témoins externes droits : lysine, acide aspartique, glycocolle, alanine, valine et leucine; témoin externe gauche : dépôt sur un trait d'un centimètre et demi du composé « X »; entre les deux : fraction « X » à séparer).

Après le développement dans le butanol acétique et la révélation à la ninhydrine des témoins externes (droit et gauche), le chromatogramme est découpé en 10 parties selon les notations X1, X2,... X10 dans le sens de la migration dans le butanol.

Les composés X1 et X2, qui sont faiblement ninhydrine positifs ont des R_F analogues à ceux de la lysine et de l'acide aspartique.

La tache principalement ninhydrine positive (composé « X3 »), possède un R_F voisin du glycocolle, tandis que les composés X4, X5, X6, ont un R_F comparable à celui de l'alanine; X7, X8 ont un R_F analogue à la valine ainsi que X9, X10, qui ont un R_F avoisinant celui de la leucine.

De X4 jusqu'au X10, les dérivés sont tous négatifs au réactif à la ninhydrine, mais quelques-uns d'entre eux ont une fluorescence en lumière ultraviolette.

Une deuxième élution aqueuse de *chaque bande* (X i avec i = 1 à 10) est pratiquée. Après dessiccation par une ventilation d'air froid, chaque éluat est repris par 4 ml d'eau.

C'est sur ces 10 éluats que les différentes études suivantes sont pratiquées.

a) *Hydrolyse totale de X1 et X2.*

Après hydrolyse totale, une électrophorèse à pH 3.9 des deux hydrolysats nous montre qu'ils sont composés par des acides aminés à comportement « Neutres ». Etant donné leur faible concentration avant hydrolyse dans la fraction « X », une étude plus détaillée ne nous a pas paru indispensable.

b) *Hydrolyse totale de X4, X5, X6.*

Nous trouvons en très faible quantité, quelques acides aminés à comportement « Neutres » dans ces hydrolysats.

Etant donné que l'on peut récupérer plus ou moins d'acides aminés « Neutres » au cours de l'élution du papier chromatographique, nous n'avons pas poussé davantage cette étude.

c) *Hydrolyse totale de X7, X8, X9, X10.*

L'analyse des hydrolysats nous révèle un aspect déjà plus net, car nous avons trouvé une quantité très importante d'acide glutamique. L'acide pyroglutamique a un RF voisin de celui de la valine et de la leucine et sa migration électrophorétique à pH 3.9 est comparable à celle de la fraction

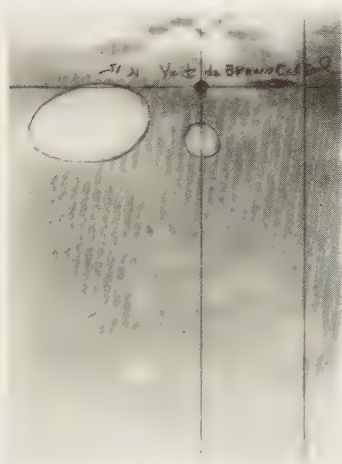


FIG. 16. — Révélation de X3 au Vert de Bromocrésol.

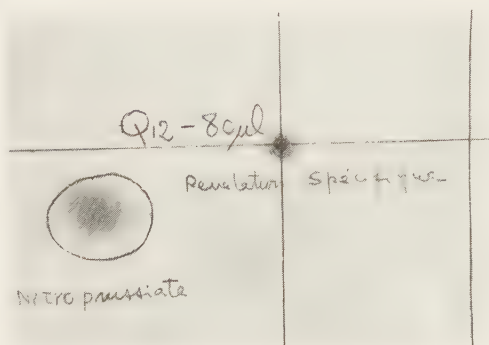


FIG. 17. — Révélation de X3 au réactif de Nitroprussiate et NaCN.

FIG. 16, FIG. 17. — Electrochromatographie de la fraction « A ».

La position de X3 est entourée au crayon (grosse tache).

Electrophorèse à pH 3,9.

Chromatographie dans le butanol (voir technique IDa).

« X », mais l'acide pyroglutamique ne donne pas de réaction à la ninhydrine.

D'ailleurs, en étudiant la fraction « A » totale d'un liquide d'ascite, une révélation spécifique au vert de bromocrésol sur un électrochromatogramme (d'après la technique décrite dans I Da), nous montre une faible tache jaune sur un fond vert à l'emplacement présumé de l'acide pyroglutamique.

L'augmentation de l'acide glutamique après hydrolyse totale ne peut provenir de l'hydrolyse de l'acide folique qui pourrait éventuellement se trouver dans le liquide d'ascite, car le comportement électrophorétique à pH 3.9 de cet acide folique est nettement différent de celui de la fraction « X ».

Donc, la majeure partie de l'acide glutamique trouvé dans l'ensemble du composé « X » provient en fait des sous-fractions X7 à X10.

d) Etude de X3.

Avant la mise en œuvre des diverses études, il est indispensable de décrire quelques épreuves préliminaires.

1) Tests d'homogénéité.

Un couplage électrochromatographique (d'après la technique I Da) et une chromatographie bidimensionnelle (avant et après oxydation de X3), nous montrent qu'il est bien homogène et qu'il ne se dédouble pas, même après oxydation par H_2O_2 .

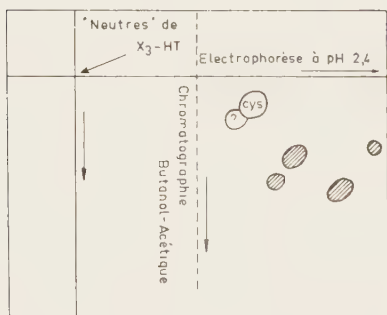
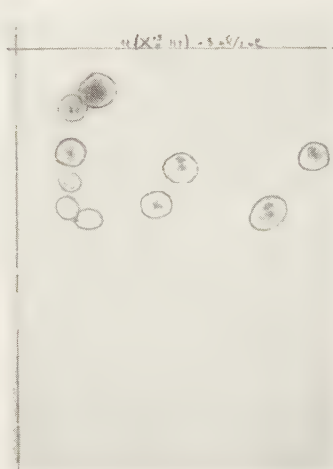


FIG. 18. — Electrochromatogramme des « Neutres » de l'hydrolysate de X3.

Cys : cystine.



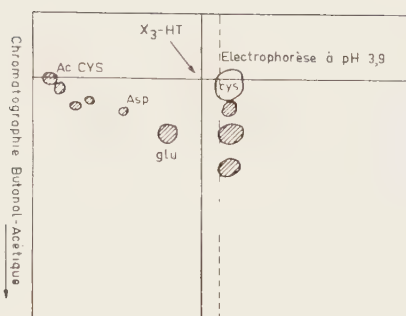
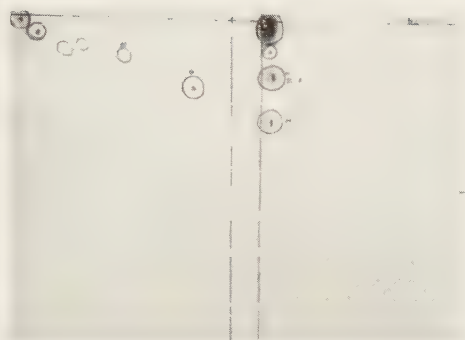


FIG. 19. — Electrochromatogramme de l'hydrolysate de X3.

Cys : cystine
 Glu : acide glutamique
 Asp : acide aspartique
 Ac. cys. : acide cystéique.

2) Révélations spécifiques sur des électrochromatogrammes de X3 (d'après la technique décrite dans I Da).

α) Au réactif de Rydon Smith, modifié par PAN et DUTCHER (23) :

Une tache brune apparaît à l'emplacement habituel de X3.

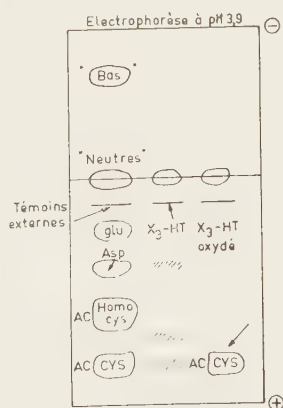
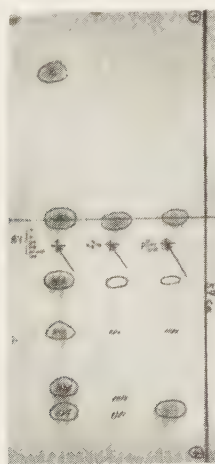


FIG. 20. — Electrophorégramme de l'hydrolysate de X3 avant et après oxydation.

Bas : acides aminés basiques
 « Neutres » : acides aminés neutres
 Glu : acide glutamique
 Asp : acide aspartique
 Ac Homocys : acide homocystéique
 Ac. cys. : acide cystéique.

β) Vert de Bromocrésol (d'après la technique décrite dans le chapitre premier : II Eb3) (fig. 16) :

Une importante tache jaune apparaît sur un fond vert.

γ) Au réactif de Nitroprussiate-NaCN (d'après la technique décrite dans II Cb2) (fig. 17) :

Une tache rougeâtre apparaît sur un fond jaune, ce qui nous indique que le composé X3 contient vraisemblablement un groupe disulfure.

3) *Hydrolyse totale de X3.*

Nous avons procédé sur cet hydrolysât à une étude aussi systématique et complète que possible avec tous les moyens dont nous disposions.

a) Electrophorèse de l'hydrolysât de X3 à pH 3,9 (Technique I Ca).

L'hydrolysât de X3 est composé principalement par des acides aminés à comportement « neutres », suivi par l'acide glutamique et des acides aminés à comportement « basiques » en faibles quantités.

i) L'identification des acides aminés « Neutres » de l'hydrolysât de « X3 » (séparés au préalable par électrophorèse à pH 3,9) est réalisée par le couplage électrochromatographique (d'après la technique I Db).

ii) Chromatographie bidimensionnelle des acides aminés « Neutres » (séparés au préalable par électrophorèse à pH 3,9) de l'hydrolysât de X3 (Etude avant et après oxydation).

Dans le chromatogramme avant oxydation, on retrouve la prédominance de la cystine. Il existe d'ailleurs un composé, en moins grande quantité, qui se situe juste à côté de la cystine et dont la nature est inconnue.

Après oxydation, il apparaît de l'acide cystéïque sur le chromatogramme. Tous les autres acides aminés qui existent en faible quantité ne sont pas modifiés par l'oxydation.

iii) Electrophorèse à pH 11,7 des acides aminés « basiques » (séparés au préalable par électrophorèse à pH 3,9) de l'hydrolysât de X3 (d'après la technique I Cb).

La lysine est présente en faible quantité, les autres acides aminés « basiques » ne sont présents qu'à l'état de trace.

Nous avons pu déceler la présence prédominante de la cystine. La glycine et la sérine, l'alanine ne sont présentes qu'en faible quantité. Nous pouvons encore signaler l'existence d'une faible tache (fig. 18) ninhydrine positive juste à côté de la cystine.

β) Couplage électro-chromatographique de l'hydrolysate de X3 (pH 3,9 et chromatographie dans le butanol-acétique d'après la technique décrite dans I Da).

La présence de tous les acides aminés identifiés dans le paragraphe précédent (α) est confirmée. *Mais la tache de la cystine est toujours très nettement dominante* (fig. 19).

γ) Electrophorèse à pH 3,9 de l'hydrolysate de X3 avant et après oxydation (d'après la technique I Ca).

En présence des témoins externes, la présence de la cystine est confirmée par une nette augmentation de l'acide cystéique après oxydation par l'eau oxygénée de X3. Il ne peut s'agir d'acide homocystéique comme nous l'avons vérifié en utilisant des témoins externes (voir fig. 20).

δ) Chromatographie bidimensionnelle de l'hydrolysate de X3 avant et après oxydation (d'après la technique décrite dans I B) (fig. 21).

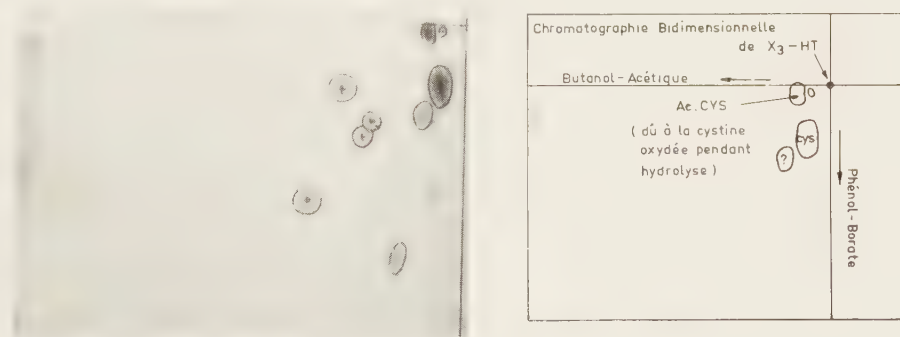


FIG. 21. — Chromatogramme de l'hydrolysate de X3 avant oxydation.

Ac. cys. : acide cystéique.

Cys. : cystine.

La prédominance de la cystine ne fait plus de doute. Les autres acides aminés n'existent qu'à l'état de traces.

4) Dinitrophénylation de X3.

(D'après la technique décrite dans le premier chapitre II F).

Le composé X3 a été dinitrophénylé dans les conditions classiques décrites par BISESTE et Coll. (17). La durée de l'hydrolyse du dérivé dinitrophénylé (le DNP-X3 dans la fig. 15) est de 12 h dans l'HCl 5,6 N à 100° C.

2) *Chromatographie bidimensionnelle (d'après la technique I B) de la phase aqueuse de l'hydrolysât de DNP-X3.*

Nous retrouvons en faible quantité les acides aminés du paragraphe précédent, *sauf la cystine*, des traces de glycocolle, lysine, acide glutamique et sérine sont donc décelées.

β) *Chromatographie bidimensionnelle dans le système toluène-phosphate (voir II F) de la phase étherée de l'hydrolysât de DNP-X3.*

Nous avons trouvé DEUX TACHES JAUNES dans la zone du chromatogramme où se situent les DNP-cystines et les DNP-cystéïnes (voir fig. 22 schéma).

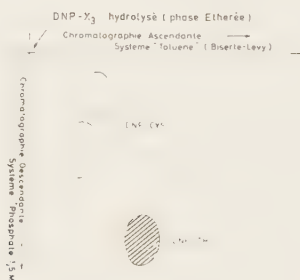


FIG. 22. — Schéma **CALQUÉ** sur le chromatogramme de DNP-X3 hydrolysé (phase étherée).

i) Pour essayer d'identifier ces deux taches, nous avons effectué de nombreuses synthèses en dinitrophénylant la cystine et la cystéïne (BISERTE et Coll.) (17), pour obtenir la mono-DNP-cystine, la di-DNP-cystine, la di-DNP-(S,N)-cystéïne, la mono-DNP-S-cystéïne * et l'acide DNP-cystéïque.

D'après les chromatogrammes bidimensionnels, les deux taches proviennent **VRAISEMBLABLEMENT**, de la DNP-(N, N')-cystine (ou de la mono-DNP-N-cystine) et de la di-DNP-(S, N)-cystéïne.

Dans ces dérivés de synthèse, sont éthersolubles la di-DNP-(N, N')-cystine et la di-DNP (S, N)-cystéïne, tandis que les autres sont hydrosolubles. D'autre part, en chromatographie bidimensionnelle, le comportement de l'acide cystéïque est le seul qui soit *nettement* différent des autres dérivés de synthèse.

* Il est très difficile d'obtenir la mono-DNP-(N)-cystéïne.

Dans ces conditions, nous pouvons conclure que les seuls dérivés qui proviennent de la phase étherée de l'hydrolysat de DNP-X3 sont, soit la di-DNP-(N, N')-cystine ou la di-DNP-(N, S)-cystéine.

D. — Conclusion.

La zone du composé « X » contient principalement après hydrolyse totale de l'acide glutamique et de la cystine.

L'origine de l'acide glutamique se situe au niveau des composés (X7-X10) qui ont un Rf très comparable à celui de l'acide pyroglutamique.

La sous-fraction « X » qui donne la réaction à la ninhydrine la plus intense est le dérivé X3.

Ce dérivé est homogène en chromatographie et acide en électrophorèse. Mais il est assez *résistant vis-à-vis de l'hydrolyse* chlorhydrique classique. Il contient principalement de la cystine comme acide aminé. *Mais à plusieurs reprises, nous n'avons pas été capables d'identifier cette cystine dans l'hydrolysat par suite de la difficulté d'hydrolyse.*

Il possède vraisemblablement un groupe disulfure (réactif nitroprussiate- NaCN).

D'après les résultats de dinitrophénylation, un groupe α -aminé libre de ce dérivé appartient soit à la cystine, soit à la cystéine.

Nous pouvons éliminer la présence d'un dipeptide cystéinyl-glycocolle dont le comportement est neutre en électrophorèse.

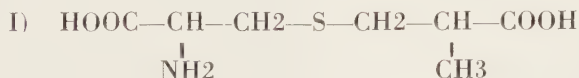
Nous avons songé à l'existence d'acide mercapturique. Mais ces dérivés n'ont pas de groupement α -aminé terminal LIBRE et NE PEUVENT réagir avec le dinitro-fluoro-benzène.

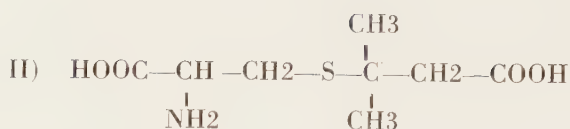


acide mercapturique

X = halogène ou hydroxyle.

MIZUHARA et OOMORI (24) très récemment viennent de déceler l'existence d'un S-(2-méthyl-2-carboxyl-éthyl)-cystéine (I) dans l'urine humaine et d'étudier le comportement chromatographique d'un autre dérivé acide et soufré, le S-(1, l'-diméthyl-2-carboxyl-éthyl)-cystéine (II) obtenu par synthèse.





Le composé « X » que nous avons isolé ne peut correspondre à l'un ou l'autre de ces nouveaux composés : *car leurs comportements chromatographiques sont différents*. Il est possible toutefois que l'on retrouve dans le composé « X » des analogies structurales avec des composés dérivés de la cystine, qui soient à la fois acides et dinitrophénylables.

CINQUIEME CHAPITRE

MÉTHODES DE CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES ACIDES AMINÉS

A. — GÉNÉRALITÉS.

De nombreuses méthodes de dosage des acides aminés mettant en œuvre des techniques de séparation par chromatographie et électrophorèse sur papier ont été déjà proposées.

Les unes se font par détermination directe sur le papier ; d'autres nécessitent une élution préalable, soit de l'acide aminé lui-même, soit de la tache colorée obtenue après la révélation.

a) *Estimation directe des taches.*

Le procédé employé consiste à estimer l'intensité des taches obtenues par révélation.

1) *Comparaison visuelle des taches.*

PELSON et WYCKOFF (25) (26) ont mis au point une méthode qui est seulement applicable aux acides aminés parfaitement séparés. Elle est presque exclusivement réservée à la chromatographie unidimensionnelle. Elle consiste à comparer visuellement sur le même chromatogramme, la dimension et l'intensité de la coloration de la tache formée par un acide aminé avec une gamme étalon, obtenue avec des quantités connues et croissantes de ce même acide aminé. Cette méthode ne peut être considérée que comme semi quantitative et la précision ne dépasse guère ± 20 pour cent dans les meilleurs cas.

2) *Mesure de la surface des taches.*

FISCHER et Coll. (27, 28) ont montré que la surface des taches colorées des acides aminés, appliquées sous le même volume est proportionnelle au logarithme de leur teneur en acide aminé. Le chromatogramme est révélé à la ninhydrine et les contours des taches sont marqués soigneusement au crayon. La surface peut être planimétrée ou peut être décalquée sur un papier millimétré.

En remplaçant la ninhydrine par l'isatine, il est possible, d'après JUTISZ (29), de doser la proline avec une meilleure approximation.

ACHER et Coll. (13) ; REDFIELD et Coll. (30), ont trouvé que les contours des taches de proline révélées par l'isatine sont plus nets qu'avec la ninhydrine. ALBANESE et Coll. (31) ont traité le mélange des acides aminés par un sel de cuivre de telle manière que le complexe (Cu-Acide aminé) puisse être soumis sous cette forme à la chromatographie. Après le développement, le chromatogramme est révélé par une solution de ferrocyanure de fer qui donne une coloration rose avec les complexes du cuivre. La surface de la tache obtenue dans ces conditions est proportionnelle à la concentration. Cette méthode surtout, a été utilisée par ces auteurs pour le dosage de la lysine.

La principale difficulté dans cette technique est la détermination exacte de la surface des taches dont la régularité et l'homogénéité sont indispensables à la précision. En outre, l'obtention d'un papier présentant une structure parfaitement régulière est difficile. Les écarts sont voisins de ± 10 pour cent. La technique, elle aussi, n'est utilisable qu'après une résolution totale et parfaite des acides aminés.

3) *Densitométrie directe des taches.*

BLOCK (32) a mesuré l'intensité de la coloration de la tache, obtenue avec la ninhydrine sur le papier, à l'aide d'un photomètre. La mesure s'effectue directement à l'aide d'un photomètre équipé d'un chariot qui déplace le chromatogramme à vitesse constante devant un dispositif qui enregistre les densités optiques.

De nombreux auteurs (33, 34, 35, 36) ont proposé des variantes et précisé certains détails concernant la photométrie des chromatogrammes. GRASSMANN et Coll. (37), ont notamment réalisé l'étude densitométrique directe sur le papier imbibé par une huile de transparence.

La mesure des surfaces délimitées par les divers pics obtenus et l'axe des abscisses permet de déduire les quantités des divers aminoacides en se référant à des courbes témoins.

4) *Analyse par rétention.*

WIELAND et WIRTH (38) ont décrit une technique d'analyse « par rétention ».

Le mélange à analyser est tout d'abord chromatographié dans la première dimension de la manière habituelle avec le système solvant approprié.

Dans la deuxième direction, on réalise un relargage avec une solution à

1 pour cent d'acétate de cuivre dans le tétrahydrofurane. La révélation par une solution (1 % de l'acide dithio-oxamide) permet de constater la présence d'encoches négatives d'autant plus importantes que les acides aminés correspondants sont plus abondants.

Les courbes de référence, réalisées à partir de quantités croissantes de l'acide aminé montrent que la surface des encoches est bien proportionnelle à la teneur de l'acide aminé mis en jeu. La précision de la technique est diminuée par l'irrégularité de la structure du papier.

b) Elution de l'acide aminé suivie d'une colorimétrie.

Dans les méthodes de dosage utilisant ce principe, il convient naturellement de localiser avec précision les acides aminés avant de procéder à leur découpage puis à leur élution et à leur coloration.

1) Localisation des acides aminés.

La localisation des acides aminés est très délicate et constitue une difficulté non négligeable de cette technique.

NAPHTALIN (39), LANDUA et COLL. (40), ont localisé les acides aminés sur le chromatogramme après l'avoir traité avec une solution diluée de ninhydrine (0.02 à 0.05 pour cent) dans le butanol. Le chauffage à 70-80° C pendant 10-20 minutes est nécessaire pour que les taches soient visibles. On les entoure d'un trait de crayon. La précision de cette méthode est très variable selon la concentration des divers acides aminés présents dans le milieu biologique à doser.

FOWDEN, WOIWOD (41) examinent le chromatogramme en lumière ultraviolette après élimination totale du solvant. Un chauffage du chromatogramme pendant 15 minutes à 100° C est nécessaire pour que les taches soient visibles. Une destruction non négligeable des acides aminés peut se produire au cours de cette opération, surtout si les solvants (le phénol en particulier) n'ont pas été totalement éliminés.

SZENT-GYÖRGYI (42) rend les acides aminés fluorescents en plongeant le chromatogramme dans l'azote liquide. La méthode n'est pas très commode.

COOK et LUSCOMBE (43) traitent le chromatogramme par une solution à 0.1 % d'acide-o-coumarique dans l'acétone. Le chromatogramme traité est chauffé dans une étuve à 100° C pendant seulement 2 minutes. Le complexe (acide-o-coumarique) apparaît coloré en jaune brique en fluorescence. L'acide-o-coumarique restant sur le papier n'est pas gênant pour la colorimétrie ultérieure s'il existe en petite quantité. Cette méthode de révélation n'est pas très sensible.

BOISSONNAS (44) a proposé l'utilisation d'un tampon garni de multiples pointes. Celui-ci, trempé dans une solution de ninhydrine, est appliqué sur le papier. Après chauffage, on peut observer des zones pointillées violettes aux endroits où se trouvent des acides aminés. Cette méthode est relativement commode pour les taches à forte concentration. Elle est difficilement applicable pour les taches à faible concentration.

2) *Colorimétrie du liquide d'élution des acides aminés.*

BOISSONNAS, d'après BLOCK (10), (44), (45), avant de procéder à la révélation à la ninhydrine, réalise un traitement du chromatogramme par une solution alcoolique de potasse à un pour cent qui a l'avantage d'éliminer toute trace d'ammoniaque et qui permet d'obtenir des témoins peu colorés.

FOWDEN (46) se débarrasse également de l'ammoniaque de ses chromatogrammes par une solution de soude diluée et utilise une technique de coloration à la ninhydrine dans des conditions bien précises, notamment en ce qui concerne le pH.

MARTIN et COLL. (47), WOJWOD (48), KURODA (49) ont appliqué la technique de POPE-STEVENSON au dosage des acides aminés. Le principe de cette technique consiste à former avec les acides aminés un complexe cuivrique. Le dosage peut ensuite être effectué par colorimétrie, par polarographie ou par mesure de la radioactivité si la technique a mis en jeu du ^{64}Cu .

c) *Elution et Spectrophotométrie de la coloration développée directement sur papier.*

Ces techniques sont praticables aussi bien en chromatographie monodimensionnelle que bidimensionnelle. Il n'est pas indispensable de faire toutes les déterminations en présence de témoins, du fait de la meilleure reproductibilité des résultats.

Les chromatogrammes peuvent être développés sans aucune restriction dans tous les solvants appropriés. Pour certains solvants (phénol, méthacrésol) un lavage du papier avec un autre solvant (mélange d'acétone et d'éther) est toutefois nécessaire.

SMITH (50) après une révélation partielle à la ninhydrine, procède à l'élution des taches et termine la révélation « in vitro » en utilisant une solution de ninhydrine additionnée de SnCl_2 . La coloration est extraite au butanol et la mesure spectrophotométrique pratiquée à $5.700 \text{ \AA}$ pour tous les acides aminés, à l'exception de la proline, pour laquelle la lecture se fait à $4.600 \text{ \AA}$.

WELLINGTON (51) révèle les acides aminés avec une solution de ninhydrine à 2 % dans l'alcool. Le développement de la coloration dure 30 heures à 20° C en atmosphère humide. Les taches sont éluées par une solution de propanol à 50 pour cent. La lecture se fait à 5.700 Å sauf pour la proline (lecture à 4.400 Å).

THOMPSON et COLL. (52) ont pratiqué la chromatographie sur des feuilles de papier préalablement lavées par de l'acide chlorhydrique et de la soude 0,3 N, afin d'obtenir un fond blanc. Le chromatogramme est révélé par une solution à 2 pour cent de ninhydrine dans l'alcool à 95° contenant 2 pour cent d'un mélange de collidine-lutidine (1 : 3). Après pulvérisation et séchage, le chromatogramme est placé dans une étuve à 50° C pendant 3 minutes dans une atmosphère de CO₂ en équilibre avec de l'éthanol liquide. La révélation de la coloration doit se faire en absence d'oxygène. Les taches découpées à partir du chromatogramme sont éluées à la température ordinaire pendant 30 minutes par 10 ml d'alcool à 50 pour cent. La densité optique de cette solution est déterminée à 5.700 Å sauf pour la proline (lecture à 3.300 Å). La précision est de $\pm 5-6$ %.

LEWIS (53) révèle le chromatogramme avec une solution diluée de ninhydrine (0,4 pour cent dans l'isopropanol aqueux à 10 pour cent. Au moment de l'utilisation, on ajoute à cette solution 5 pour cent de collidine). Après chauffage à 80-90° C pendant 20 à 25 minutes dans une atmosphère humide, les taches sont découpées et la coloration est éluee en faisant passer de la vapeur d'eau à travers la surface découpée qui est placée dans un tube de verre. Un filtre en verre fritté est disposé dans la partie inférieure du tube pour arrêter les fibres de papier. La vapeur condensée est recueillie dans un petit tube contenant quelques cristaux d'acétate de soude. Cette solution est transvasée quantitativement dans la microcuve d'un photomètre. La cuve est pesée pour déterminer le volume de la solution et on mesure la densité optique à 6.060 Å. La méthode est précise; les écarts oscillent autour de ± 5 %.

La méthode que nous avons utilisée est celle proposée par BISERTE et COLL. (54) (55); elle consiste en une élution de la coloration à la ninhydrine développée directement sur papier, élution suivie d'une mesure spectrophotométrique rapportée à une gamme étalon préalablement établie pour chaque acide aminé.

d) *Discussion sur la valeur des méthodes.*

Comme nous avons déjà eu l'occasion de le dire, les méthodes de dosage des acides aminés dans les milieux biologiques par des techniques chromatographiques et électrophorétiques sur papier sont très nombreuses et nous n'en avons cité que quelques-unes parmi les plus courantes.

Le caractère délicat de la mise en œuvre de certaines d'entre elles est évident et peut rendre difficile leur utilisation en grande série dans un laboratoire. Aussi, il nous semble utile de les comparer afin d'essayer de dégager leurs avantages respectifs et de permettre de choisir celle qui semble apporter les meilleurs résultats en fonction des possibilités d'équipement dont on dispose.

1° Les méthodes de dosage fondées sur *l'estimation directe des taches* ne peuvent donner, d'une façon générale, qu'une approximation semi-quantitative, qu'il s'agisse de la comparaison visuelle des taches (méthode de PELSON et COLL. (25), qui évidemment dépend avant tout de l'appréciation très subjective d'une intensité de coloration), ou d'une mesure de la surface des taches (méthode de BLOCK) (10) : ces deux dernières méthodes, tout en étant relativement commodes et rapides, ne peuvent atteindre une précision suffisante, puisqu'elles ne tiennent pas compte des différences de colorations données par les divers acides aminés et ne peuvent guère s'appliquer qu'après des séparations monodimensionnelles qui bien souvent sont imparfaites. Elles peuvent toutefois être utilisables pour comparer la teneur en acides aminés libres et en acides aminés totaux d'un même milieu biologique.

2° Les méthodes fondées sur *l'élution des acides aminés* à partir du chromatogramme ou de l'électrophorégramme, élution suivie d'une colorimétrie « in vitro » sont séduisantes, mais la difficulté majeure de leur utilisation réside dans la localisation des acides aminés à éluer. Si le repérage des acides aminés est relativement facile en chromatographie ou électrophorèse monodimensionnelle par l'emploi de témoins latéraux, il devient très délicat dans les systèmes de séparation bidimensionnelle et il conduit souvent à des erreurs par suite de décalage fréquemment observé entre le R_F d'un acide aminé pris isolément et celui du même acide aminé inclus dans un milieu biologique plus ou moins complexe.

Les révélations partielles (méthode de BOISSONNAS) ou des révélations préalables de localisations (méthode de NAPHTALIN) (39) qui permettent de situer facilement les acides aminés à éluer, peuvent par contre amener une cause d'erreur non négligeable dans la colorimétrie définitive.

Le procédé élégant qui consiste à repérer les acides aminés par leur fluorescence en lumière de WOOD, n'est malheureusement possible qu'après élimination totale du solvant; le chauffage prolongé à 100° C qui permet une telle élimination provoque une destruction importante et inégale selon les acides aminés. La fluorescence observée après immersion des chromatogrammes dans l'azote liquide selon la technique proposée par SZENT-GYÖRGYI (42) ne provoque aucune destruction d'acide aminé mais elle est peu commode.

3° Les méthodes qui procèdent à la révélation du chromatogramme suivie d'une élution de la coloration sont nombreuses. Elles sont parfaitement applicables en chromatographie bidimensionnelle. Mais de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la coloration et par suite la valeur du dosage. Le temps de chauffage, la température du chauffage, le degré de saturation en eau de l'enceinte de chauffage, la composition du réactif à la ninhydrine (notamment la nature du solvant organique et le taux de ninhydrine) sont parmi les conditions de révélation, les facteurs les plus importants pour la reproductibilité des résultats. Aussi, quelle que soit la méthode retenue, convient-il de respecter scrupuleusement toutes les conditions expérimentales adoptées pour la révélation qui doit être parfaitement standardisée.

En outre, dans ces techniques, il est indispensable d'obtenir un « fond » de papier qui soit régulièrement peu coloré. Aussi, est-on dans l'obligation d'éliminer toute trace d'ammoniaque; certains auteurs ont même été amenés à procéder à des lavages du papier utilisé et à traiter les chromatogrammes par une solution de potasse sous vide.

Enfin, un impératif sur lequel nous ne saurions trop insister, a trait aux lectures spectrophotométriques : pour avoir une certaine valeur, les résultats exprimés en densité optique doivent être obligatoirement rapportés à une courbe témoin, qui a été préalablement établie pour chaque acide aminé strictement dans les mêmes conditions que le dosage, et qui présente une reproductibilité éprouvée par une dizaine d'essais.

B. — *Mode opératoire de la Technique utilisée.*

Le dosage est pratiqué après avoir suivi le plan général de séparation qui permet une résolution satisfaisante des divers acides aminés.

Les différentes étapes de séparation ont été décrites dans le détail dans la partie qualitative : aussi, nous n'en rappellerons que les grandes lignes.

Pour les acides aminés dicarboxyliques, l'acide cystéique, la beta-alanine, l'acide gamma-amino-butyrique, l'acide bêta-amino-isobutyrique, les glutathions, et la colamine, la fraction A est soumise au couplage bidimensionnel suivant : électrophorèse à pH 3.9 suivie d'une chromatographie dans le butanol-acide acétique (voir le chapitre Techniques I Da).

— Pour les acides aminés « Neutres » : séparation préalable des acides aminés en électrophorèse à pH 3.9. Elution de la bande des acides aminés neutres et couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 2.4 suivie d'une chromatographie dans le butanol-acide acétique-eau (voir Technique I Db)).

— Pour les acides aminés « Basiques » : séparation préalable en électrophorèse à pH 3.9. Elution de la bande correspondant aux acides aminés

« basiques ». Electrophorèse à pH 11,7 ou éventuellement électrophorèse à pH 6,5 (voir technique I Cb et I Cc).

— Pour les dosages séparés de la leucine et de l'isoleucine, chromatographie bidimensionnelle à partir de la fraction A avec le système butanol-acétique (première dimension) et le système solvant de HÖGSTRÖM (16) (deuxième dimension).

a) *Révélation. Elution. Dosage.*

Les chromatogrammes ou électrophorégrammes sont séchés à la température de la pièce pendant 4 jours, dans une atmosphère privée d'ammoniaque. Les feuilles de papier sont trempées complètement dans le réactif à la ninhydrine. La formule du réactif pour les acides aminés « Neutres », l'acide gamma-amino-butyrique, l'acide bêta-amino-isobutyrique, la bêta-alanine et la colamine est la suivante : ninhydrine à 1 pour cent (poids/volume) dans l'acétone contenant 10 pour cent (volume/volume) de tampon phosphate 0,05 M de pH 7 (Na_2HPO_4 6g 390/1 et acide citrique 960 mg/l) (d'après BELL et Coll.) (56).

Les feuilles sont égouttées et séchées pendant une heure dans une atmosphère privée d'ammoniaque puis portées à l'étuve à 37° C pendant 15 h.

Les surfaces englobant la totalité de la coloration et des surfaces voisines, de mêmes dimensions, servant de blanc, sont découpées sur le papier et éluées par 3 ml d'acétone contenant 25 % d'eau pendant 20 minutes sous agitation discontinuée. Après centrifugation les colorations sont lues, dans l'heure qui suit l'éluion, au spectrophotomètre à 5.750 Å contre le blanc provenant d'un emplacement du chromatogramme le plus voisin possible de la tache à doser. Les lectures spectrophotométriques pour l'asparagine se font à 3.500 Å. Avec cette révélation, la proline et l'hydroxyproline forment un complexe violet après un séjour à l'étuve à 37° C. Toutefois, après le séchage à la température de la pièce, les colorations sont jaunes pour la proline, et orange pour l'hydroxyproline : ces deux colorations caractéristiques permettent une identification commode de ces deux acides aminés que l'on peut repérer avant de porter les feuilles dans l'étuve à 37° C.

Pour la révélation des acides aminés basiques (lysine, ornithine, arginine, histidine, et méthyl-histidine) la formule du réactif est la suivante : ninhydrine à 1 pour cent (poids/volume) dans l'acétone contenant 6 pour cent d'acide acétique.

La conduite de la révélation est identique à celle qui est décrite plus haut et la lecture spectrophotométrique se fait à 5.750 Å.

Les valeurs de densité optique pour chaque acide aminé sont rappor-

tées à une gamme étalon préalablement établie pour chaque acide aminé correspondant.

Au cours des dosages des acides aminés, il convient que la densité optique pour chaque acide aminé, ne dépasse pas 0,75, car il est pratiquement impossible d'obtenir dans un milieu biologique des concentrations comparables et voisines des divers acides aminés. En conséquence, il sera nécessaire d'utiliser des concentrations variables selon l'acide aminé à doser.

Ainsi, pour 200 ml de liquide d'ascite, traités par 300 g environ de résine humide, l'ensemble de la fraction « A » est repris par 5 ml d'alcool isopropylique à 10 pour cent, et les quantités de fraction « A » à utiliser pour le dosage sont les suivantes :

— 10 mm³ de la fraction « A » pour les dosages de l'alanine, de la valine, des leucines, de la glycine, de la glutamine et de l'acide glutamique après hydrolyse.

— 20 mm³ pour l'acide glutamique, les acides aminés basiques, la sérine, la thréonine, la phényl-alanine, la tyrosine et l'acide aspartique après hydrolyse.

— 40 mm³ pour la proline, la tyrosine, après l'hydrolyse, la méthionine, l'acide alpha-amino-butyrique et la citrulline après l'hydrolyse.

— 60 mm³ pour la cystine après l'hydrolyse, l'hydroxyproline, l'asparagine, le tryptophane, la colamine et tous les autres acides aminés de faibles concentrations.

b) *Construction des Courbes de Référence* (Fig. 23 a à h).

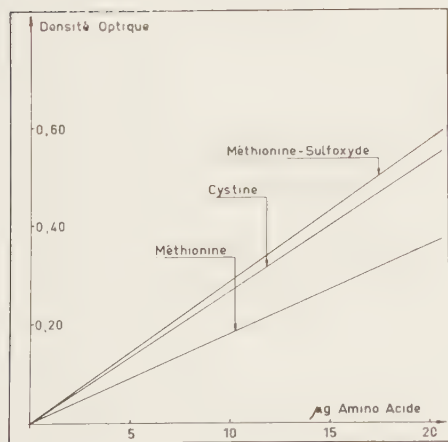


FIG. 23 a. — Courbes de référence.

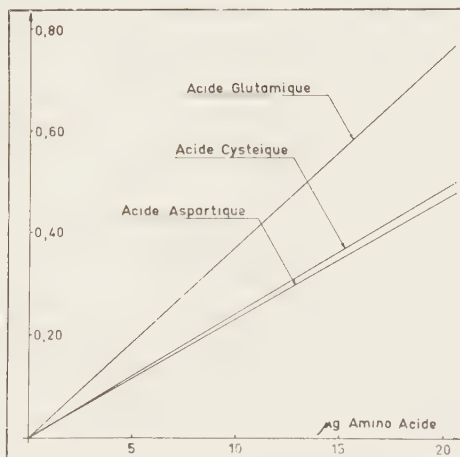


FIG. 23 b. — Courbes de référence.

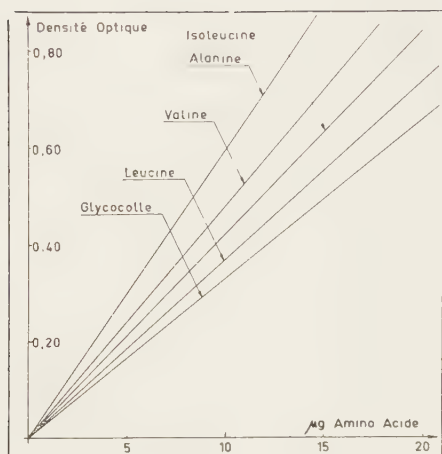


FIG. 23 c. — Cources de référence.

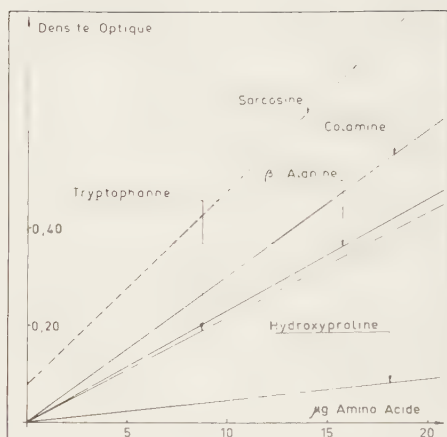


FIG. 23 d. — Courbes de référence.

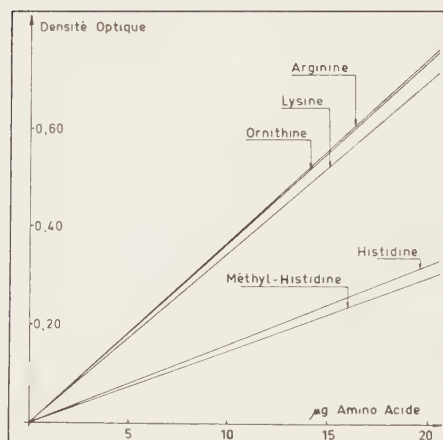


FIG. 23 e. — Courbes de référence.

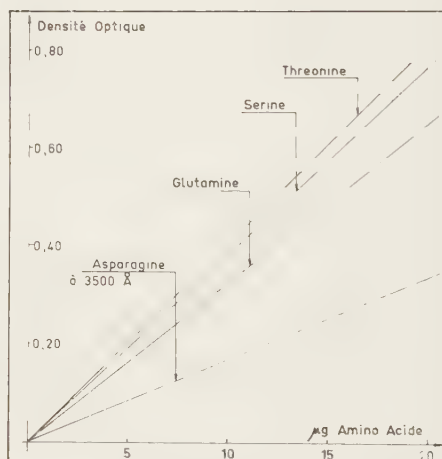


FIG. 23 f. — Courbes de référence.

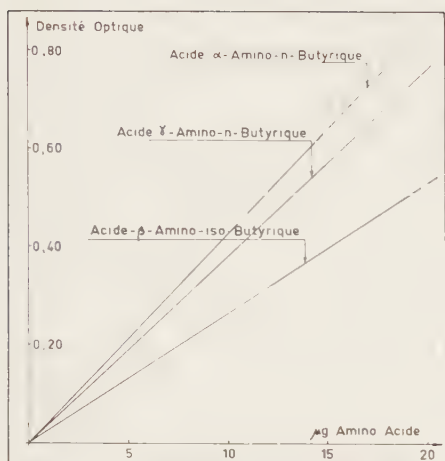


FIG. 23 g. — Courbes de référence.

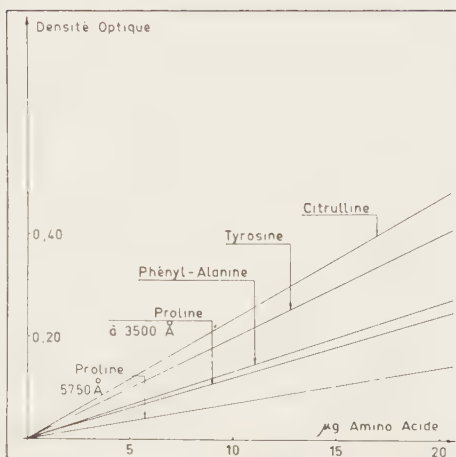


FIG. 23 h. — Courbes de référence.

D'après la courbe de la proline à 3 500 Å, le dosage serait théoriquement plus satisfaisant, mais la précision a été limitée par le blanc du témoin trop élevé.

Ces courbes de référence sont construites à partir de solutions titrées de chaque aminoacide (quantités comprises entre 0 et 20 microgrammes), en suivant les conditions expérimentales décrites dans l'étude détaillée des méthodes.

La reproductibilité des courbes de référence n'est pas affectée par le type de séparation, qu'il soit chromatographique ou électrophorétique, ni par la nature du papier utilisé (Whatman n° 1 ou Whatman n° 3). Ainsi, une gamme étalon de la valine ou de l'alanine peut être développée soit en chromatographie sur une feuille de Whatman n° 1, soit en électrophorèse sur une feuille de Whatman n° 3 ou vice-versa. Toutefois, l'emploi du papier Arches 304, pour la construction de ces courbes étalon est déconseillé, car il diminue sensiblement la précision (± 10 pour cent d'écart sont obtenus).

Néanmoins, quelques précautions doivent être observées pour l'établissement des gammes témoins des acides aminés suivants :

— Pour la cystine, la gamme étalon doit être obligatoirement établie après électrophorèse : car la cystine, peu soluble dans l'eau, doit être solubilisée dans l'acide chlorhydrique dilué. Si le développement se fait

en chromatographie, le Rf de la cystine se superpose plus ou moins à celui de « l'acide chlorhydrique », ce qui empêche la révélation normale à la ninhydrine même après une longue ventilation à froid. Par contre, la pente de la courbe est bien reproductible après une étape électrophorétique.

Dans le cas de la tyrosine, qui est aussi très peu soluble dans l'eau, la gamme étalon peut être néanmoins établie par chromatographie (butanol-acétique), car la révélation s'effectue normalement. Ceci est dû au fait que le Rf de la tyrosine dans le butanol-acétique est beaucoup plus élevé que celui de « l'acide chlorhydrique ».

Pour la proline et l'hydroxyproline, le développement sur une feuille de papier Whatman n° 3 est indispensable. Les complexes proline-ninhydrine et hydroxyproline-ninhydrine sont brunâtres après séjour de 15 h à 37° C (*) sur un support de papier Whatman n° 1, tandis que leur coloration est bien pourpre sur une feuille de papier Whatman n° 3. Pour ces deux acides aminés, la nature du papier fait varier considérablement la pente de la courbe (cette pente est beaucoup plus faible quand on utilise le papier Whatman n° 1). Cette remarque est également valable pour le tryptophane.

e) *Conclusions.*

Il est indispensable de pratiquer les dosages d'une manière très standardisée et de respecter scrupuleusement certaines conditions expérimentales, telles que la concentration de la solution de ninhydrine, la pureté des réactifs (ninhydrine, acétone), le pH du tampon employé, la température au cours de la coloration, l'atmosphère exempte d'ammoniaque dans la pièce où les chromatogrammes sont séchés, l'homogénéité du trempage de la feuille de papier.

Ces conditions étant respectées, on peut attendre pour le dosage des acides aminés une précision :

- de 5 pour cent pour l'alanine, la lysine.

— en deçà de 10 pour cent pour la glycine, l'ornithine, l'arginine, la valine, la citrulline, la glutamine, l'acide glutamique, la méthionine, les leucines et l'acide alpha-amino-butérique.

— de 10 pour cent pour la cystine, la sérine, la thréonine, l'acide cystéique, l'acide aspartique, la phénylalanine, la tyrosine, la bêta-alanine.

* Une élévation ou une diminution d'un degré de la température de l'étuve fait varier beaucoup la reproductibilité des résultats de dosage de la proline, de l'hydroxyproline, et du tryptophane.

l'acide bêta-amino-isobutyrique, l'acide gamma-amino-butyrique et la colamine.

- de 15 pour cent pour l'histidine et les méthyl-histidines.
- de 20 pour cent pour la proline.
- de 25 pour cent pour l'hydroxyproline, l'asparagine et le tryptophane.

C. — *Addendum : Principe de la Réaction à la Ninhydrine* (57, 58), (66).

Il peut être utile de rappeler le principe de la réaction à la ninhydrine.

La révélation des acides aminés à la ninhydrine est due à la formation d'un complexe coloré.

L'acide amino réagit avec l'hydrate de tricétohydrindène (Ninhydrine) en fixant un oxygène pour donner un acide alpha-cétonique. L'hydrindantine réagissant à son tour avec une nouvelle molécule de ninhydrine et une molécule d'ammoniaque conduit à un composé qui en présence d'ammoniaque donne lieu à la formation d'un complexe coloré, le sel d'ammonium de dicétohydrindylène-dicéto-hydrindamine.

(Voir le schéma des réactions) (58).

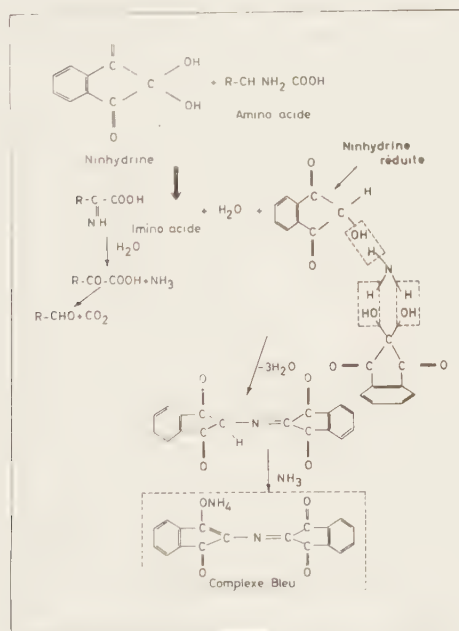


FIG. 24.

Schéma des réactions

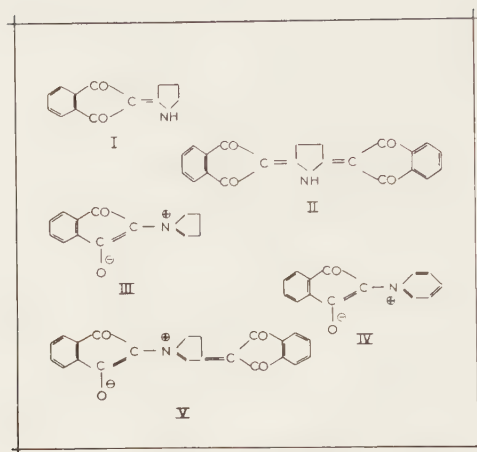


FIG. 25

Les réactions entre la ninhydrine et les imino-acides sont un peu différentes des réactions générales précédemment décrites. D'ailleurs, le complexe coloré ninhydrine-proline, tantôt jaune, tantôt pourpre et celui ninhydrine-hydroxyproline tantôt orange, tantôt pourpre, ont attiré l'attention des chercheurs depuis fort longtemps (59).

GRASSMANN et Coll. (60) ont proposé les formules I et II (fig. 25) pour le complexe ninhydrine-proline (jaune) et ninhydrine-proline (pourpre). Mais ces formules n'ont pas été retenues pour plusieurs raisons : en spectrographie infra-rouge, il n'y a pas de bande qui corresponde à un groupement libre d'une fonction imine.

C'est pourquoi, tout récemment, JOHNSON et Mc CALDIN (61) ont proposé un autre schéma explicatif.

La formule III qui est proposée pour la coloration jaune de la proline en présence de ninhydrine, est une formule intermédiaire. Lorsque la concentration en ninhydrine est élevée, lorsque le temps de chauffage est prolongé ou la température de la révélation plus élevée, on obtient le complexe V, dont la coloration est pourpre.

La formule IV correspond au complexe ninhydrine et acide pipécolique. D'après les travaux de GROBBELAR et Coll. (62), le complexe est coloré en bleu.

TABLEAU N° 1

LIQUIDES D'ASCITE ETHY

[illegible]

•

	N° 20			N° 22			N° 23			N° 25			N° 26			N° 27			N° 31		
T.	H. T.			H. T.			H. T.			H. T.			H. T.			H. T.					
27	0,16	3,00	0,24	1,53	0,26	3,11	0,12	1,60	0,48	2,78	0,13	1,48	0,21	3,12							
20	0,86	12,20	2,16	5,00	3,92	9,70	1,10	5,40	4,23	8,72	3,40	6,40	2,78	8,60							
	1,26	/	0,98	/	0,60	/	0,70	/	1,12	/	1,35	/	0,30	/							
	0,95	/	0,70	/	1,00	/	0,70	/	1,00	/	0,50	/	1,20	/							
19	9,00	0,38	3,39	0,42	5,25	0,32	5,50	0,40	3,76	0,87	2,20	0,23	2,84	0,65							
15	3,85	5,62	3,95	4,63	3,65	5,25	2,54	3,40	3,64	4,88	2,74	3,52	2,20	4,00							
10	1,55	3,12	3,16	3,75	3,16	4,65	2,16	3,00	2,50	3,50	1,68	2,36	2,19	3,68							
10	2,12	2,50	1,44	1,92	1,63	2,95	1,33	1,87	1,74	2,52	1,90	2,28	1,15	2,50							
.0	/	/	/	/	0,80	1,50	/	/	/	/	1,10	1,20	0,50	1,00							
10	/	/	/	/	0,95	2,50	/	/	/	/	1,32	2,29	0,60	2,82							
8	1,45	4,00	1,59	2,80	1,65	4,35	1,68	3,14	1,95	3,80	2,45	3,36	1,09	3,87							
5	1,30	3,40	1,88	2,25	1,60	3,56	2,70	3,60	2,64	4,10	2,72	2,86	1,88	4,17							
0	2,02	0,94	2,28	0,50	1,44	0,50	1,05	0,40	2,00	1,90	1,73	0,82	1,53	1,53							
0	2,50	4,76	2,70	3,32	3,20	4,40	2,94	5,30	2,94	3,80	2,40	3,50	2,81	4,72							
	/	/	0,20	0,35	/	/	/	/	0,90	0,90	0,30	0,45	0,31	0,35							
0	1,50	2,26	1,46	1,46	2,10	2,46	1,02	0,95	1,95	3,20	3,20	3,20	1,30	2,36							
2	1,50	2,76	1,56	1,73	1,65	2,92	1,17	1,23	1,57	2,25	1,50	1,40	1,31	2,54							
2	0,15	0,19	0,21	0,17	0,32	0,14	0,24	0,13	0,22	0,18	0,30	0,30	0,15	0,10							
2	0,83	0,31	0,88	0,79	0,79	0,79	0,77	0,40	0,80	0,84	0,63	0,35	0,17	0,56							
0	/	0,09	/	1,00	/	0,50	/	0,05	0,41	0,94	/	0,15	0,58	0,79							
0	1,20	2,00	0,40	1,00	0,58	1,09	1,30	2,00	0,59	1,26	0,95	1,20	0,78	1,71							
2	3,60	5,25	1,80	2,32	1,90	3,08	2,00	3,20	2,04	3,33	2,10	2,68	1,52	3,45							
0	0,65	0,95	0,64	0,68	0,51	0,61	0,67	0,70	0,50	0,65	0,68	0,85	0,31	0,46							
2	1,00	1,87	0,91	0,94	1,10	2,38	2,00	2,20	0,89	1,13	1,13	1,13	1,20	2,05							
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,06	0,10							
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,12	/							

TABLEAU N° II

LIQUIDES D'ASCITE CARDIAQUE (mg/100 ml)

	N° 5		N° 7		N° 8		N° 17		N° 21	
	H. T.		H. T.		H. T.		H. T.		H. T.	
Ac. Aspartique	0,28	1,84	0,12	1,78	0,17	2,70	0,14	3,05	0,16	2,60
Ac. Glutamique	6,92	8,88	1,36	6,84	1,36	8,16	2,60	10,00	1,35	14,20
"X"	1,57	/	1,16	/	0,86	/	0,81	/	0,81	/
dosé comme Ac.										
Cystéique										
Asparagine	1,35	/	0,80	/	0,90	/	1,35	/	1,00	/
Glutamine et	2,23	0,71	7,52	0,07	3,32	0,35	8,00	0,53	11,60	0,54
Citrulline										
Glycine	2,58	2,80	2,73	3,28	3,28	3,36	4,34	7,00	4,10	6,00
Alanine	1,60	2,60	3,60	4,60	3,54	4,40	3,35	4,75	1,91	3,80
Valine	1,24	2,37	2,60	2,90	2,46	3,08	2,31	3,75	1,56	2,94
Isoleucine	/	/	/	/	1,10	1,60	/	/	0,95	1,50
Leucine	/	/	/	/	1,50	2,80	/	/	1,20	3,20
Leucines	1,78	4,17	3,38	4,40	2,70	4,10	3,05	5,50	2,06	4,95
Phényl-Alanine	1,58	3,18	2,26	2,60	2,74	2,72	2,47	4,54	1,75	4,35
Tyrosine	0,58	0,40	2,00	0,25	2,50	1,09	2,45	1,46	1,95	0,94
Proline	2,40	6,52	2,34	3,20	3,54	3,96	2,20	5,10	1,84	4,07
Hydroxy-Proline	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Thréonine	0,76	1,34	1,22	1,23	1,25	3,45	1,50	2,18	1,13	2,13
Serine	0,63	1,30	1,43	1,50	1,33	1,65	1,25	2,06	1,03	2,70
Ac. Alpha-Amino	0,13	0,16	0,05	0,22	0,05	0,13	0,14	0,05	0,17	0,15
Butyrique										
Méthionine-	0,31	0,29	0,53	0,35	0,45	0,22	0,60	0,54	0,53	0,36
Sulfoxyde										
Cystine	/	0,50	/	0,30	/	0,50	/	0,62	/	0,14
Arginine	0,42	1,00	0,83	1,10	0,95	1,30	0,55	1,25	0,86	1,32
Lysine	2,26	4,68	3,16	3,85	3,00	4,32	2,00	3,57	3,00	4,41
Ornithine	0,87	2,20	0,60	0,90	1,08	1,44	0,69	1,00	0,89	1,00
Histidine	1,32	2,00	1,50	1,50	1,43	2,20	0,71	1,63	1,00	1,57
Colamine	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Tryptophanne	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

TABLEAU N° III

	NEOPLASIQUES (mg/100 ml)							
	LIQUIDES D'ASCITE				LIQUIDE PLEURAL			
	N° 30		N° 33		N° 29		N° 32	
	H. T.		H. T.		H. T.		H. T.	
Ac. Aspartique	0,38	3,60	0,21	2,00	0,43	3,05	0,71	3,17
Ac. Glutamique	3,31	10,00	1,72	8,00	5,06	12,80	2,44	10,15
"X"	1,87	/	1,67	/	1,65	/	0,18	/
dosé comme Ac.								
Cystéique								
Asparagine	1,20	/	0,75	/	1,30	/	1,00	/
Glutamine et	5,50	0,32	4,55	0,40	5,62	0,33	4,25	0,38
Citrulline								
Glycine	2,60	4,31	3,30	5,50	3,44	3,82	1,85	2,82
Alanine	2,17	3,70	2,12	4,00	3,26	4,41	3,55	4,85
Valine	1,95	3,25	3,04	4,12	3,37	4,08	2,41	3,70
Isoleucine	0,85	1,54	0,86	1,50	/	/	1,10	2,40
Leucine	1,40	4,05	2,03	3,20	/	/	1,45	3,20
Leucines	2,41	5,50	2,72	5,00	4,56	6,08	2,65	5,27
Phényl-Alanine	1,31	1,63	2,30	3,20	2,35	2,70	1,44	3,70
Tyrosine	0,86	0,57	1,30	0,50	2,25	0,42	1,63	1,76
Proline	3,35	4,45	3,75	4,25	3,68	4,25	2,96	4,88
Hydroxy-Proline	1,00	1,35	0,06	0,10	0,80	0,96	0,18	0,31
Thréonine	1,28	3,70	1,00	1,00	2,10	2,66	0,93	2,56
Serine	1,35	2,35	1,31	1,40	1,97	2,38	0,94	2,19
Ac. Alpha-Amino	0,14	0,16	0,25	0,20	0,30	0,22	0,23	0,12
Butyrique								
Méthionine-	0,26	0,18	0,32	0,30	0,35	0,47	0,18	0,71
Sulfoxyde								
Cystine	0,31	0,90	/	0,20	/	0,28	0,14	0,93
Arginine	0,75	1,71	0,90	1,70	0,88	1,87	0,60	1,53
Lysine	2,01	4,25	2,42	4,00	3,14	5,00	1,72	4,00
Ornithine	0,36	0,45	0,60	0,80	0,47	0,64	0,44	0,65
Histidine	1,00	2,05	0,95	1,50	1,47	1,81	0,82	2,38
Colamine	0,12	0,16	/	/	/	/	0,10	0,12
Tryptophanne	0,15	/	0,08	/	/	/	0,12	/

TABLEAU N° IV

	LIQUIDES D'ASCITE D'ORIGINES MIXTES (mg/100 ml)														Liquides d'Ascite d'origines mixtes	
	N° 1		N° 2		N° 4		N° 10		N° 13		N° 24		N° 28			
	H. T.		H. T.		H. T.		H. T.		H. T.		H. T.		H. T.			
Ac. Aspartique	0,12	1,40	0,12	2,00	0,26	1,74	0,29	2,26	0,15	2,62	0,32	2,82	0,32	2,50		
Ac. Glutamique	3,37	9,70	3,50	9,80	3,74	5,12	1,05	7,82	3,57	10,25	1,49	10,50	1,78	10,42		
"X"	0,95	/	0,64	/	1,20	/	0,70	/	0,60	/	1,27	/	0,62	/		
dosé comme Ac.																
Cystéique																
Asparagine	0,60	/	1,00	/	0,22	/	1,00	/	1,20	/	1,05	/	1,30	/		
Glutamine et	5,12	0,86	5,80	0,68	3,64	0,28	6,18	0,24	7,85	0,72	9,60	0,47	5,27	0,46		
Citrulline																
Glycine	1,68	2,17	2,73	2,94	2,92	3,28	3,40	6,00	3,82	5,10	3,35	4,13	1,92	3,55		
Alanine	1,56	2,20	3,06	3,96	2,70	3,72	2,94	4,00	2,84	4,50	3,30	4,20	2,66	3,75		
Valine	1,25	1,70	1,86	2,16	1,90	2,66	1,86	2,47	2,17	3,34	2,32	3,33	1,98	3,22		
Isoleucine	/	/	/	/	/	/	/	/	1,40	2,00	/	/	1,48	1,70		
Leucine	/	/	/	/	/	/	/	/	1,45	3,70	/	/	1,94	3,40		
Leucines	2,15	3,20	1,60	3,25	2,16	4,00	1,95	3,63	2,95	5,90	2,23	4,48	2,52	5,27		
Phényl-Alanine	1,87	3,03	2,72	3,72	2,38	3,74	1,90	3,12	2,21	4,45	2,65	3,12	2,07	3,88		
Tyrosine	1,38	1,33	1,74	1,40	1,65	0,46	1,82	0,20	2,56	0,75	4,05	0,70	1,73	1,08		
Proline	2,92	4,00	4,30	8,64	2,50	6,50	3,10	5,60	2,03	3,75	2,75	4,46	2,24	3,85		
Hydroxy-Proline	0,02	0,20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	trace	0,46		
Thréonine	0,86	1,00	1,33	2,12	1,29	1,63	0,87	1,22	1,58	2,32	2,60	1,34	1,24	2,15		
Serine	1,00	1,10	1,30	1,50	1,84	2,00	1,85	2,06	1,91	2,54	1,87	2,00	1,25	2,21		
Ac. Alpha-Amino	0,07	0,10	0,08	0,08	0,05	0,10	0,26	0,16	0,12	0,25	0,30	0,37	0,34	0,40		
Butyrique																
Méthionine-	0,60	0,55	0,67	0,60	0,66	0,30	0,60	0,37	0,56	0,52	1,25	0,52	0,56	0,33		
Sulfoxyde																
Cystine	/	0,07	/	0,10	/	0,08	/	0,28	/	1,10	/	0,43	/	0,70		
Arginine	0,31	0,60	0,67	1,20	0,45	1,10	0,55	1,24	0,92	1,30	1,12	1,90	0,86	1,85		
Lysine	1,66	2,66	3,36	3,80	2,52	3,50	2,53	4,08	2,40	4,50	2,75	4,00	2,70	4,75		
Ornithine	0,44	0,98	0,78	1,12	0,73	0,80	0,38	1,00	1,37	2,00	0,95	1,10	0,32	0,58		
Histidine	0,42	1,15	0,85	1,41	1,68	1,70	1,18	1,30	1,25	1,78	1,58	1,70	0,72	1,52		
Colamine	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
Tryptophanne	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		

Liquide d'Ascite
Cancer du Foie

Liquides d'Ascite (mg/100 ml)
Tuberculeux

N° 11
H. T.

0,18 2,45
3,17 8,00
0,53 /

0,90 /
3,65 0,35

2,95 4,12
4,30 5,75
2,78 3,70
1,50 2,50
2,40 4,00
3,80 6,60
2,37 4,15
2,37 0,31
9,30 16,00
/ /
1,36 2,06
1,29 2,04
0,41 0,45

0,75 0,20
/ 0,20
0,57 1,26
2,12 4,07
0,36 0,58
0,79 1,46
/ /
/ /

N° 6
H. T.

0,43 2,23
3,75 5,25
0,66 /

1,60 /
3,14 0,05

3,12 3,28
3,25 4,20
2,62 3,38
/ /
/ /
4 06 5,15
2,65 2,81
0,42 0,03
2,70 3,00
/ /
1,41 1,42
1,75 1,62
0,16 0,21

0,35 0,29
/ 0,43
0,63 1,12
3,02 3,84
0,66 0,78
1,51 1,57
/ /
/ /

N° 9
H. T.

0,27 2,94
2,33 5,08
0,90 /

1,00 /
6,14 0,22

3,52 3,52
2,20 3,08
2,14 2,50
1,52 2,00
2,10 2,40
3,37 4,14
1,80 2,20
1,52 0,30
4,00 5,60
/ /
1,30 1,06
2,20 1,48
0,14 0,14

0,55 0,26
/ 0,30
0,43 0,80
1,93 3,00
0,50 0,68
0,93 1,05
/ /
/ /

TABLEAU N° V

	Moyenne des Ascites (mg/100 ml) 32 Cas	2 σ	Liquide pleural (mg/100 ml)	Moyenne d'après KNAUFF ^x 23 Cas (mg/100ml)	OBSERVATIONS ^x Liquides d'Ascite et Pleuraux.
Ac. Aspartique	0,23		0,21	0,71	0,48 ^x
Ac. Glutamique	2,73		2,84	2,44	1,79
"X"	1,05		0,93	0,18	0,37 ^x
dosé comme Ac. Cys					
Asparagine	1,04		0,55	1,00	non mentionné
Glutamine et	5,75		4,50	4,25	supérieur à 3,82 ^x
Citrulline					
Citrulline	(0,66) ^x		(0,57)	(0,58)	non mentionné
Glycine	3,18		1,94	1,85	4,47
Alanine	2,69		1,56	3,55	5,89
Valine	1,95		1,33	2,41	2,49
Leucine	1,43 ^x		1,03	1,45	1,36
Isoleucine	1,14 ^x		0,63	1,10	1,81
Leucines	2,37		2,00	2,65	3,17
Phényl-Alanine	2,17		1,00	1,44	1,55
Tyrosine	1,79		1,42	1,63	1,86
Proline	3,18		3,02	2,96	3,45
Hydroxy-Proline	0,52 ^x		0,42	0,18	0,31 ^{xx}
Thréonine	1,43		1,12	0,93	0,04 ^x
Serine	1,44		0,72	0,94	(0,57) ^x
Ac. Alpha-Amino	0,20		0,23	0,23	0,23
Butyrique					
Méthionine	0,59		0,61	0,16	0,98 ^x
Cystine	0,36 ^x		0,37	0,14	0,45
Cystéine	non dosé		/	/	0,009 ^x
Arginine	0,71		0,50	0,60	1,15 ^x
Lysine	2,40		1,18	1,72	3,18
Ornithine	0,63		0,47	0,44	0,55 ^x
Histidine	1,20 ^x		0,77	0,82	2,11
Colamine	0,09 ^x		0,05	0,10	0,12
Tryptophanne	0,11 ^x		0,07	0,12	non dosé
Ac. Gamma-Amino		TRACE	NON	DOSE	
Butyrique					
Ac. Beta-Amino		TRACE	NON	DOSE	
Isobutyrique					
Beta-Alanine		TRACE	NON	DOSE	
Méthyl-Histidine		TRACE	NON	DOSE	
Acide Pipécolique	NON	DOSE ^x			non mentionné
Taurine	NON	DOSE			0,31

^x 12 Cas présents sur 60
dont 7 en Quantitative

TABLEAU N° VI

APRES HYDROLYSE (mg/100 ml)

	Moyenne des Liquides d'Ascite 32 Cas	2 σ	Moyenne d'un Liquide pleural	Observations
Ac. Aspartique	2,44	1,21	3,17	
Ac. Glutamique	8,67	4,92	10,15	
Citrulline	0,43 ^x	0,37	0,38	^x voir Quantitative discussion sur la Citrulline
Glycine	4,28	2,46	2,82	
Alanine	3,81	1,60	4,85	
Valine	2,81	1,45	3,70	
Leucine	2,94 ^x	1,31	3,20	^x 14 Cas
Isoleucine	1,58 ^x	0,79	2,40	^x 14 Cas
Leucines	4,35	2,24	5,27	
Phényl-Alanine	3,33	1,43	3,70	
Tyrosine	0,70	0,92	1,76	
Proline	5,08	5,00	4,88	
Hydroxy-Proline	0,71 ^x	1,06	0,31	^x 10 Cas
Thréonine	1,94	1,54	2,56	
Serine	1,96	0,98	2,19	
Acide Alpha-Amino- Butyrique	0,20	0,20	0,12	
Méthionine	0,44	0,17	0,62	
Cystine	0,42	0,61	0,93	
Arginine	1,36	0,70	1,53	
Lysine	3,88	1,88	4,00	
Ornithine	0,94	0,90	0,65	
Histidine	1,67	0,76	2,38	
Colamine	0,12 ^x	0,06	0,12	^x 4 Cas
Ac. γ -Am.-Buty.	0,04 ^x			^x 1 Cas
Ac. Beta-Amino- Isobutyrique	0,05 ^x			^x 1 Cas
Beta-Alanine	0,07 ^x			^x 1 Cas
Méthyl-Histidines	0,05 ^x			^x 1 Cas
Acide Pipécolique	non dosé ^x			^x 7 Cas présents sur 33 en Quanti- tative.

SIXIEME CHAPITRE

ANALYSE QUANTITATIVE DES AMINO-ACIDES DES LIQUIDES D'ASCITE

A. — *Bilans analytiques.*

Nous avons étudié quantitativement les acides aminés totaux et libres des 32 liquides d'ascite de diverses origines (5 cardiaques, 2 tuberculeuses, 14 cirrhotiques d'origine éthylique, 7 d'origine mixte ou cirrhotique non éthylique, 3 d'origine néoplasique — avec des cellules néoplasiques dans le liquide d'ascite —, un liquide d'ascite consécutive à un cancer du foie) et un seul liquide pleural d'origine néoplasique.

Tous les résultats sont rassemblée dans les tableaux n° I, n° II, n° III, n° IV.

Le tableau n° I contient les résultats analytiques des 14 liquides cirrhotiques d'origine éthylique (avant et après hydrolyse), le tableau n° II les résultats analytiques des 5 liquides cardiaques (avant et après hydrolyse), le tableau n° III les résultats analytiques des trois liquides néoplasiques et d'un liquide pleural néoplasique (avant et après hydrolyse), le tableau n° IV les résultats analytiques de sept liquides cirrhotiques d'origine non éthylique ou mixte, d'un liquide consécutif à un cancer du foie et de deux liquides tuberculeux.

a) *Résultats généraux* (tableau n° V et n° VI).

Nous avons réalisé ainsi une détermination quantitative des acides aminés libres et totaux des liquides d'ascite.

— *Parmi les acides aminés à comportement acide*, l'acide glutamique est très nettement prédominant avant l'hydrolyse. Après hydrolyse totale, on note une forte augmentation de l'acide glutamique et surtout de l'acide aspartique, aux dépens de quelques-unes de leurs formes combinées et notamment de l'asparagine et de la glutamine.

— *Parmi les acides aminés à comportement neutre*, présents à l'état libre dans les liquides d'ascite, la glutamine, la proline, le glycocole, l'alanine, la valine, les leucines, la phénylalanine et la tyrosine sont à une concen-

tration relativement élevée, tandis que l'asparagine ainsi que les deux aminoacides hydroxylés (sérine et thréonine), sont moins abondants; d'autres aminoacides n'existent qu'à une très faible concentration ou même à l'état de traces, tels la citrulline, la méthionine, l'hydroxyproline, la cystine et l'acide alpha-amino-butyrique.

— Sont constamment présents à l'état libre, quatre aminoacides à comportement basique : l'arginine, l'histidine, la lysine et l'ornithine. La lysine est de loin celui qui présente la concentration la plus élevée.

b) *PROBLEMES PARTICULIERS* (Tableaux n° V et n° VI).

1° *Méthionine-Sulfoxyde.*

Etonnés de la présence constante de méthionine sulfone et de méthionine sulfoxyde dans le liquide d'ascite, nous avons cru bon de rechercher si ces deux composés d'oxydation pouvaient provenir de la méthionine au cours des différentes étapes de la méthode (préparations, fractionnement, élution, chromatographie et dosage).

Dans ce but, nous avons ajouté à un liquide d'ascite une quantité connue de méthionine et nous avons dosé les dérivés d'oxydation de la méthionine.

— Le liquide d'ascite sur lequel nous avons opéré cette recherche contient lui-même, avant toute addition, 0,57 mg de méthionine sulfoxyde pour 100 ml.

— Dans un premier essai, nous avons ajouté 5 mg de méthionine pour 100 ml de liquide d'ascite. Les dosages pratiqués montrent la présence de :

1,24 mg de méthionine pour 100 ml.

4,20 mg de méthionine-sulfoxyde pour 100 ml.

Ces 4,20 mg de méthionine-sulfoxyde contiennent naturellement la quantité préexistante dans le liquide d'ascite avant toute addition de méthionine, soit 0,57 mg/100 ml. Ce qui revient à dire que 4,20—0,57, soit 3,63 mg de méthionine-sulfoxyde proviennent de l'oxydation de la méthionine. En conséquence, on peut admettre qu'au cours de ces manipulations, environ 65 pour cent de la méthionine ont été transformés en méthionine sulfoxyde.

— Dans un second essai sur le même liquide d'ascite, nous avons ajouté 100 mg de méthionine pour 100 ml. Les dosages pratiqués montrent la présence de :

— méthionine à l'état de traces telles qu'un dosage n'a pu être pratiqué.

— 105 mg de méthionine-sulfoxyde pour 100 ml. Ces 105 mg correspondent presque uniquement à l'oxydation de la méthionine ajoutée puisque le taux avant toute addition n'était que de 0,57 mg. Cette quantité de

méthionine-sulfoxyde correspond donc à l'oxydation de la plus grande partie de la méthionine ajoutée (94 %). Le pourcentage d'oxydation varie donc suivant les modalités opératoires.

Or, une chromatographie bidimensionnelle, effectuée directement à partir du liquide d'ascite additionné de 100 mg de méthionine, nous a montré que la méthionine se situe à sa place normale et qu'elle n'a pas été oxydée. C'est donc au cours des manipulations qui précèdent le dosage, que s'effectue l'oxydation de la méthionine. L'oxydation a lieu principalement au cours de l'élution automatique de la bande des acides aminés neutres séparés par électrophorèse à pH 3,9. La ventilation prolongée d'air chaud oxyde la méthionine.

La différence de pourcentage d'oxydation est due à la durée plus ou moins longue d'élution sur le dispositif automatique. Ces réactions secondaires ne sont pas tellement gênantes. Nous avons en général exprimé la quantité de méthionine des liquides d'ascite sous la forme de méthionine sulfoxyde. Une simple correction permet de calculer la concentration en méthionine *.

Le dosage effectué grâce au couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 2,4 — chromatographie dans le butanol), ne permet pas de séparer la méthionine sulfoxyde de la méthionine sulfone; toutefois, au cours de l'étude qualitative, il nous a été possible de vérifier par chromatographie bidimensionnelle (butanol-acide acétique-eau et phénol-tampon borate à pH 9,3) que la méthionine sulfoxyde représente la majeure partie de la méthionine oxydée.

2° Cystine.

La cystine libre (avant hydrolyse) n'existe qu'à l'état de traces. Dans la plupart des cas le dosage ne peut donc être réalisé. Nous n'avons réalisé que 4 dosages sur les 33 liquides.

Après hydrolyse, le taux de cystine est plus élevé (en moyenne 0,42 mg/100 ml). En conséquence, la cystine existe principalement sous forme combinée. Dans un chapitre ultérieur, nous reviendrons sur ces formes combinées de cystine, en étudiant systématiquement les hydrolysats des éluats de toutes les bandes des électrophorégrammes effectués à pH 3,9.

Nous avons dosé ensemble la cystine et la cystéine (les résultats sont exprimés en cystine), car nos techniques séparatives (électrophorèse, chromatographie) ne permettent pas une bonne résolution de ces deux acides

* La diminution de la méthionine après hydrolyse totale a été constatée déjà par STEIN et MOORE (63).

aminés. Signalons toutefois, que KNAUFF a trouvé des taux très faibles de cystéine (0,009 mg/100 ml) par rapport à ceux de la cystine, soit 1/50 (0,456 mg/100 ml) (20).

3° *Citrulline.*

Comme nous l'avons signalé plus haut, la technique de séparation adoptée (couplage bidimensionnel), ne permet pas de séparer la citrulline de la glutamine. Aussi, le dosage de la citrulline n'est-il possible qu'après une hydrolyse totale, qui élimine la glutamine.

Nous avons toutefois essayé de vérifier la stabilité de la citrulline au cours de l'hydrolyse totale. Une solution de citrulline 0,01 M est soumise à l'hydrolyse totale et des dosages sont effectués avant et après hydrolyse; dans ces conditions, 65 pour cent seulement de la citrulline résistent à l'hydrolyse *.

Il convient donc en principe de corriger les résultats obtenus. Ainsi la valeur moyenne obtenue pour la citrulline dans les 32 liquides d'ascite est de 0,43 mg pour 100 ml. Le taux réel, compte tenu de la destruction partielle de la citrulline au cours de l'hydrolyse serait de l'ordre de 0,66 mg pour 100 ml.

D'autre part, nous avons vérifié en chromatographie bidimensionnelle que la citrulline (qui est alors bien séparée de la glutamine), présente une concentration approximativement du même ordre de grandeur avant et après hydrolyse totale. Il n'y a donc pas de formes combinées de citrulline dans ces milieux biologiques.

4° *Glutamine.*

Le problème posé par le dosage de la glutamine est rattaché à celui de la citrulline puisque nous avons déjà vu que ces acides aminés se superposent lors du couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 2,4 et chromatographie dans le butanol acétique). Le dosage par différence avant et après hydrolyse permet de déduire le taux de glutamine étant donné que les courbes de référence de la glutamine et de la citrulline présentent une pente assez voisine.

Ainsi, la moyenne trouvée dans 32 liquides d'ascite pour l'ensemble (citrulline + glutamine) avant hydrolyse totale est de 5,75 mg/100 ml. Le taux de la citrulline (valeur corrigée) étant de 0,66 mg pour 100 ml,

* Soumise aux conditions relativement brutales de l'hydrolyse totale (HCl 5,6 N à 100°C pendant 24 h.), la citrulline se décompose en libérant de l'ornithine que l'on peut facilement identifier en électrophorèse à pH 3,9 et à pH 11,7.

la concentration de la glutamine peut être évaluée à 5,09 mg/100 ml (5,75 — 0,66). Cette valeur moyenne est naturellement approximative.

Les valeurs trouvées dans la littérature (KNAUFF) (20) pour la glutamine, et obtenues par la méthode de MOORE et STEIN (21) ne sont précisées que par l'indication d'un taux supérieur à 3,82 mg/100 ml.

5° *Hydroxyproline.*

L'hydroxyproline présente dans tous les liquides d'ascite étudiés, existe toutefois à une concentration relativement faible et variable, ainsi qu'en témoignent les moyennes des valeurs obtenues sur 10 cas (avant et après hydrolyse). Nous avons trouvé respectivement 0.52 et 0.71 mg/100 ml. avec un écart type particulièrement élevé.

Nous ne croyons pas devoir attribuer une valeur trop absolue à ces résultats; à titre de référence signalons que les résultats rapportés par KNAUFF (20) pour l'hydroxyproline (avant l'hydrolyse totale) sont du même ordre de grandeur que les nôtres (0,31 mg/100 ml).

Le manque de précision du dosage de l'hydroxyproline tient sans doute au fait que la pente de la courbe de référence de l'hydroxyproline à 5.750 Å * est particulièrement faible. Par ailleurs, on peut être également gêné par un chevauchement de l'hydroxyproline et de la méthionine-sulfoxyde au cours du couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 2.4 et chromatographie dans le butanol-acétique).

6° *Tryptophanne.*

Le taux moyen de tryptophanne trouvé lors des 5 dosages est relativement faible (0,11 mg/100 ml) ; ce dosage est également délicat.

7° *Leucine — Isoleucine.*

La séparation est obtenue à l'aide du solvant de HÖCSTRÖM (16). Nous avons vérifié sur 14 liquides d'ascite que la somme des résultats obtenus au cours des dosages séparés de la leucine et de l'isoleucine est très sensiblement équivalente au résultat du dosage global des leucines (voir les tableaux n° I, n° II, n° III, et n° IV).

8° *Tyrosine.*

La diminution sensible de la tyrosine après l'hydrolyse totale (de 1,79 mg/100 ml à 0,70 mg/100 ml) est en accord avec les travaux de STEIN

* Les mesures de densité optique à 4400 Å et 3500 Å comme l'ont conseillé certains auteurs, ne nous ont pas donné de meilleurs résultats, car dans ces conditions, la densité optique obtenue avec le blanc est trop élevée.

et MOORE (63) qui ont également constaté une destruction de cet amino-acide en étudiant le sérum sanguin. (La décomposition par HCl peut toucher aussi la cystine, méthionine et proline.)

9° *Acide alpha-aminobutyrique.*

Le taux de cet amino-acide est faible (0,20 mg/100 ml). Signalons que KNAUFF (20) a trouvé des valeurs moyennes de 0,23 mg/100 ml.

10° *Méthylhistidines.*

Un seul cas sur 32 (après hydrolyse) a été dosé. La concentration est très faible 0,05 mg/100 ml.

11° *Acides- ω -aminés.*

(Béta-alanine, Acide gamma-aminobutyrique et Acide béta-amino-isobutyrique).

La béta-alanine, l'acide gamma-aminobutyrique, et l'acide béta-amino-isobutyrique existent à l'état de traces avant l'hydrolyse.

Nous n'avons effectué qu'un seul dosage de ces ω -aminoacides *après l'hydrolyse*. Leurs concentrations respectives sont de 0,07 (béta-Ala), 0,05 (béta-Amino-isobutyrique), 0,04 (gamma-Aminobutyrique) mg/100 ml.

12° *Acide pipécolique.*

Il n'a pas été dosé, mais il est présent dans 12 cas sur 60 (avant et après hydrolyse) (27 qualitatifs et 33 quantitatifs).

13° *Colamine.*

Le dosage pratiqué sur 4 liquides d'ascite indique que la colamine est présente à une concentration moyenne voisine de 0,09 mg/100 ml.

14° *Le composé « X ».*

dont nous avons entrepris la description au cours de l'analyse qualitative des liquides d'ascite est assez abondant et sa présence constante. Ne disposant naturellement pas de témoin pour établir une courbe de référence particulière, son dosage n'a pu être effectué qu'en rapportant les mesures de densité optique à une courbe-témoin choisie arbitrairement, celle de l'acide cystéique.

B. — COMPARAISON DES RESULTATS EN FONCTION DE L'ORIGINE ETIOLOGIQUE DU LIQUIDE D'ASCITE.

Nous avons rassemblé dans trois tableaux les résultats des dosages d'aminoacides libres et totaux de 32 liquides d'ascite en les groupant selon leur origine étiologique : éthylique tableau I, cardiaque tableau II et néoplasique tableau III.

Cette répartition a eu pour but de comparer les divers liquides d'ascite selon leur étiologie et de voir s'il est ou non possible d'en tirer quelques conclusions pratiques en physiopathologie.

Le tableau n° VII indique les valeurs MOYENNES des dosages d'acides aminés libres et totaux pour chacune des trois catégories (éthylique, cardiaque et néoplasique). C'est en partant de ces valeurs moyennes qu'a été effectuée une comparaison statistique en utilisant le test de STUDENT.

Dans la littérature, il n'existe pas à notre connaissance, de déterminations quantitatives à partir desquelles une étude statistique a permis d'établir une comparaison valable entre les divers liquides ascitiques selon leur étiologie. Une des difficultés pour entreprendre une telle étude réside dans le fait que d'assez nombreux liquides d'ascite que l'on étudie, ont une origine douteuse et parfois mixte. La stricte comparaison des dosages peut, si l'on n'y prend garde, prêter à confusion, ou du moins conduire à une interprétation hasardeuse.

Certains résultats peuvent apparaître concluants à première vue tandis que le calcul du test de STUDENT nous a montré que peu de différences ont en réalité une valeur significative.

Aussi, certains auteurs ont insisté sur l'augmentation de la glutamine dans le sérum des sujets cirrhotiques (BLASS) (64) qui est associée à une diminution de l'acide glutamique (BOULANGÉ) (19). Ces conclusions ont été controversées : ainsi, SEEGMILLER (65) ne trouve pas d'augmentation de la glutamine au cours du coma hépatique. Cette divergence de vue peut, semble-t-il, provenir de la dispersion relativement élevée des résultats.

Si nous reprenons cet exemple de la glutamine, non plus dans le sérum, mais dans les liquides d'ascite, nous voyons (tableau n° VII) que les valeurs moyennes trouvées dans les liquides d'origine éthylique (14 cas) et d'origine néoplasique (3 cas) semblent inférieures à celles trouvées dans les liquides d'ascite d'origine cardiaque (5 cas) — respectivement 5,30 et 5,22 mg/100 ml contre 7,52 mg/100 ml.

Cependant, étant donné la dispersion relativement élevée des résultats obtenus, nous avons jugé prudent de voir si ces différences étaient ou non

TABLEAU N° VII

	ASCITES ETHYLIQUES (14 Cas)				ASCITES CARDIAQUES (5 Cas)				ASCITES NEOPLASIQUES (3 Cas)				mg/100 ml
	Moyenne		Déviation		Moyenne		Déviation		Moyenne		Déviation		
	H. T.		H. T.		H. T.		H. T.		H. T.		H. T.		
Ac. Aspartique	0,21	2,45	0,15	0,68	0,17	2,39	0,06	0,56	0,34	2,88	0,11	0,81	
Ac. Glutamique	2,55	8,32	1,26	2,50	2,72	9,61	2,41	2,80	3,36	10,27	1,67	2,41	
"X"	1,07	/	0,53	/	1,04	/	0,33	/	1,73	/	0,12	/	
dosé comme Ac.													
Cystéique													
Asparagine	1,01	/	0,30	/	1,08	/	0,26	/	1,08	/	0,29	/	
Glutamine et	5,30	0,44	2,07	0,20	7,52	0,44	3,02	0,24	5,22	0,35	0,59	0,04	
Citrulline													
Glycine	3,29	4,48	1,28	1,17	3,40	4,49	0,79	1,88	3,11	4,54	0,45	0,86	
Alanine	2,54	3,60	0,84	0,78	2,80	4,03	0,97	0,88	2,51	4,03	0,65	0,36	
Valine	1,64	2,48	0,66	0,70	2,03	3,01	0,60	0,49	2,78	3,81	0,74	0,49	
Leucines	1,86	3,84	1,02	1,12	2,59	4,62	0,49	0,50	3,23	5,52	1,16	0,54	
Phényl-Alanine	2,16	3,43	0,51	0,63	2,16	3,48	0,49	0,91	1,98	2,51	0,59	0,80	
Tyrosine	1,72	0,72	0,53	0,51	1,90	0,83	0,78	0,50	1,47	0,49	0,71	0,08	
Proline	3,07	4,67	1,35	1,69	2,46	4,57	0,64	1,98	3,59	4,32	0,21	0,11	
Thréonine	1,59	2,01	0,64	0,76	1,17	2,07	0,27	0,89	1,46	2,45	0,57	1,36	
Serine	1,39	2,04	0,29	0,53	1,13	1,84	0,32	0,17	1,54	2,04	0,37	0,56	
Ac. Alpha-Amino	0,23	0,20	0,10	0,10	0,11	0,14	0,06	0,06	0,23	0,19	0,08	0,03	
Butyrique													
Méthionine-	0,78	0,64	0,42	0,37	0,48	0,35	0,36	0,12	0,31	0,32	0,05	0,15	
Sulfoxyde													
Cystine	/	0,46	/	0,33	/	0,41	/	0,19	/	0,46	/	0,38	
Arginine	0,78	1,42	0,28	0,33	0,72	1,19	0,23	0,14	0,84	1,76	0,81	0,10	
Lysine	2,27	3,71	0,73	1,26	2,68	4,16	0,52	0,45	2,52	4,41	0,57	0,52	
Ornithine	0,59	0,88	0,15	0,44	0,83	1,30	0,19	0,54	0,48	0,63	0,12	0,18	
Histidine	1,30	1,75	0,41	0,47	1,19	1,78	0,33	0,30	1,14	1,78	0,29	0,28	

1

1

1

6

]

6

8

1

6

6

6

6

6

9

8

n

v

e

h

e

o

significatives et, pour cette raison, nous avons calculé pour cet exemple, le test de STUDENT qui montre que ces différences, apparemment importantes, sont en réalité non significatives.

Test de STUDENT (calcul de t)

a) Glutamine des liquides d'origine éthylique comparée à glutamine des liquides d'origine cardiaque.

Valeur de $t = 1,72$.
significative à partir de 2,11.

b) Glutamine des liquides d'origine néoplasique comparée à glutamine des liquides d'origine cardiaque.

Valeur de $t = 1,04$.
significative à partir de 2,447.

C'est pour cette raison que nous avons systématiquement entrepris une étude statistique pour tous les résultats des dosages effectués.

L'énumération pour chaque aminoacide nous a semblé trop fastidieuse pour être exposée intégralement ici, et nous n'avons volontairement voulu retenir que quelques exemples parmi ceux qui nous ont semblé les plus intéressants.

CAS DE LA VALINE.

La concentration de la valine libre (avant hydrolyse) est assez différente selon qu'il s'agit d'un liquide d'origine éthylique (1,64 mg/100 ml) ou d'un liquide d'origine néoplasique (2,78 ml/100 ml). Ces variations sont significatives ($t = 2,43$; significatif à partir de 2,131).

Il en est de même pour les formes combinées de la valine. Les dosages effectués après hydrolyse totale dans les liquides d'origine éthylique donnent une concentration de 2,48 mg pour 100 ml contre 3,81 mg pour 100 ml dans les liquides néoplasiques; là encore la différence est significative ($t = 3,33$, significatif à partir de 2,131).

Par contre, une comparaison statistique des valeurs trouvées pour la valine entre les ascites d'origine cardiaque d'une part et néoplasique ou éthylique d'autre part les a révélées non significatives tant avant hydrolyse qu'après hydrolyse.

CAS DES LEUCINES

Les différences observées entre les résultats des dosages des leucines dans

les liquides d'origine éthylique, néoplasique et cardiaque ne sont pas significatives avant hydrolyse.

Après hydrolyse, les liquides ascitiques d'origine éthylique ont une concentration en leucines de 3,84 mg/100 ml contre 5,52 mg/100 ml dans les liquides néoplasiques : cette différence est significative ($t = 2,40$, significatif à partir de 2.11). Il n'est pas possible, par contre, de tenir compte des variations observées dans la teneur en leucines après hydrolyse des liquides d'origine cardiaque comparés aux liquides d'origine éthylique ou cancéreux.

CAS DE L'ORNITHINE.

L'ornithine libre présente selon l'origine des liquides d'ascite des différences qui sans être apparemment considérables sont cependant significatives.

Ainsi, les liquides d'origine cardiaque présentent une teneur en ornithine libre supérieure à celle des liquides d'origine éthylique ou néoplasique (0,83 mg pour 100 ml contre respectivement 0,59 et 0,48 mg pour 100 ml).

— cardiaque comparé à éthylique : $t = 2,78$.
significatif à partir de 2.11.

— cardiaque comparé à néoplasique : $t = 2,52$.
significatif à partir de 2.447.

CAS DE LA PROLINE.

Les variations de la proline sont inverses de celles de l'ornithine, le liquide d'origine cardiaque présentant une teneur en proline libre inférieure à celle des liquides d'origine éthylique ou néoplasique (2,46 mg pour 100 ml contre respectivement 3,07 et 3,59 mg pour 100 ml).

Mais seule la comparaison entre les taux observés dans les liquides cardiaques et néoplasiques est significative.

— $t = 2,58$.
significatif à partir de 2.447.

Si les différences trouvées entre les liquides cardiaques et éthyliques avaient été également significatives (comme c'est le cas mais en sens inverse, pour l'ornithine), il aurait été tentant d'essayer de tirer une signification métabolique de ces variations inverses de l'ornithine et de la proline puisqu'il est classique de décrire les réactions de conversion entre ces deux acides aminés, par passage intermédiaire au gamma-semialdéhyde glutamique et l'acide Δ^1 -pyrroline-5-carboxylique.

CAS DE L'ARGININE.

En comparant les liquides d'ascite d'origine cardiaque et néoplasique, on constate que l'arginine est également plus élevée après hydrolyse totale dans les liquides néoplasiques (1.76 mg pour 100 ml) que dans les liquides cardiaques (1.19 pour 100 ml).

$$-t = 5.5.$$

significatif à partir de 2,447.

En résumé, nous pouvons constater que peu de différences significatives sont à enregistrer selon l'origine étiologique des liquides étudiés. Toutefois, la comparaison des liquides d'origine éthylique et néoplasique permet de constater chez ces derniers une augmentation significative de la valine avant et après hydrolyse, ainsi que des leucines après hydrolyse totale.

Par ailleurs, les liquides d'origine cardiaque, comparés aux liquides néoplasiques, présentent une teneur moindre en arginine après hydrolyse ainsi qu'en proline libre. Inversement, ces liquides d'origine cardiaque ont une concentration en ornithine supérieure à celle des liquides d'origine éthylique.

Ces résultats, malgré le caractère limité de leurs conclusions, ne sont cependant pas dépourvus d'intérêt; outre le document analytique qu'ils représentent, peut-être pourront-ils être utilisés en tant que données physiopathologiques, pour expliquer certaines déviations métaboliques des aminoacides.

Dans cette récapitulation des résultats et cette analyse statistique, nous n'avons pas tenu compte d'un certain nombre de liquides d'ascite dont les acides aminés purent néanmoins être dosés avant et après hydrolyse.

Parmi ceux-ci, un liquide d'ascite chez un sujet présentant un néoplasme du foie (n° 11 du tableau n° IV) n'a pas été retenu du fait qu'il ne pouvait pas à coup sûr être considéré comme un liquide d'origine néoplasique.

De même les résultats des dosages des aminoacides des liquides ascitiques d'origine tuberculeuse (n° 6 et n° 9 du tableau n° IV) n'ont pas été rapportés dans cette étude statistique car ces dosages n'ont pu être pratiqués que sur un nombre trop restreint de cas, la ponction de ces liquides d'ascite n'étant pas recommandée dans l'intérêt du malade.

Enfin, certains échantillons (n° 1, 2, 4, 10, 13, 24 et 28 du tableau n° IV) n'ont également pas été soumis à la comparaison statistique des groupes, soit que leur étiologie ait été inconnue ou incertaine (cirrhotique non éthylique par exemple), soit que leur origine étiologique ait été mixte (chez des cirrhotiques présentant une insuffisance cardiaque).

C. — Dosages comparatifs dans le liquide d'ascite, le sérum et l'urine.

Il nous a semblé utile de comparer chez deux sujets ascitiques la composition en acides aminés du liquide d'ascite, du sérum et de l'urine.

De plus, un sujet présentant un épanchement pleural nous a servi à établir une comparaison à titre indicatif entre les liquides pleuraux et les liquides d'ascite qui, selon les données bibliographiques (KNAUFF) (20), présentent une répartition à peu près égale de leurs acides aminés.

Liquide pleural et liquides d'ascite.

Nous n'avons pratiqué qu'un seul dosage d'acides aminés de liquide pleural; d'une façon générale, la concentration en acides aminés, tant avant qu'après hydrolyse, est à rapprocher des moyennes trouvées dans les liquides d'ascite, compte tenu de la dispersion relative des résultats obtenus avec ces derniers. Ceci confirme du reste les résultats publiés par KNAUFF et COLL. (20) qui ont rassemblé les valeurs trouvées dans les liquides pleuraux et ascitiques (voir tableaux n° V et n° VI).

Liquides d'épanchement et sérum.

Les acides aminés ont été dosés à la fois dans le sérum et le liquide d'épanchement chez trois malades dont deux présentaient une ascite et le dernier un épanchement pleural.

Les acides aminés libres des liquides d'épanchement REFLETENT assez fidèlement les taux sériques correspondants (fig. 26, 27 et 28).

D'une façon générale, chez le même malade, le sérum présente des concentrations en acides aminés plus élevées que les liquides d'épanchement correspondants : ceci est particulièrement vrai pour certains acides aminés, particulièrement pour l'ornithine dont la concentration sérique peut atteindre le double ou le triple de la valeur observée dans le liquide; il en est de même mais à une moindre échelle, pour le glycocolle, l'alanine, la sérine, la thréonine, la lysine et la glutamine.

Par contre, la tyrosine est à une concentration moins élevée dans le sérum que dans les liquides d'épanchement ainsi que cela a déjà été signalé par des méthodes qualitatives par BOULANGÉ (19).

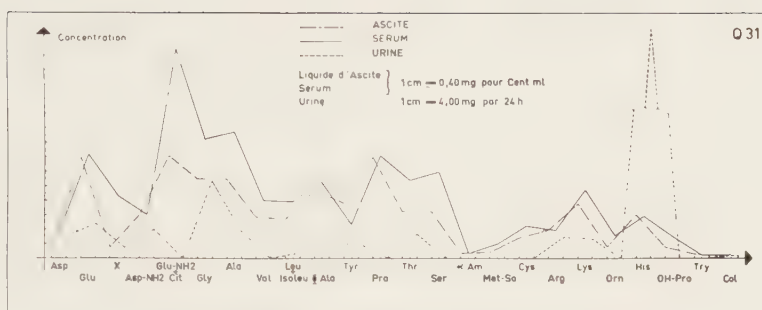


FIG. 26. — Correspondant au tableau N° VIII (avant hydrolyse). Courbes indiquant la concentration en fonction des différents acides aminés.

(Les courbes ont été décalées d'un demi-centimètre parallèlement à l'axe des abscisses pour éviter leur superposition.)

TABLEAU N° VIII

	N° 31 ETHYLIQUE			HYDROLYSE	
	Ascite mg/100 ml	Sérum	Urine mg/24 h.	Ascite mg/100 ml	Urine mg/24 h.
Ac. Aspartique	0,21	0,70	6,00	3,12	31,00
Ac. Glutamique	2,78	2,88	9,50	8,60	37,50
"X"	0,30	1,72	3,00	/	/
dosé comme Ac.					
Cystéique					
Asparagine	1,20	1,20	8,00	/	/
Glutamine et	2,84	5,80	/	0,65	/
Citrulline					
Glycine	2,20	3,30	21,50	4,00	54,00
Alanine	2,19	3,50	7,50	3,68	16,00
Valine	1,15	1,60	/	2,50	6,90
Leucines	1,09	1,57	1,62	3,87	14,20
Phényl-Alanine	1,88	2,13	3,40	4,17	13,50
Tyrosine	1,53	0,95	4,20	1,53	5,40
Proline	2,81	2,85	/	4,72	24,70
Hydroxy-Proline	0,31	0,60	/	0,35	24,00
Thréonine	1,30	2,17	6,75	2,36	9,20
Sérine	1,31	2,40	/	2,54	12,70
Ac. Alpha-Amino	0,15	0,14	/	0,10	/
Butyrique					
Méthionine-Sulfoxyde	0,17	0,40	/	0,56	/
Cystine	0,58	0,90	/	0,79	11,00
Arginine	0,78	0,79	5,85	1,71	9,90
Lysine	1,52	1,90	5,55	3,45	18,00
Ornithine	0,31	0,63	trace	0,46	trace
Histidine	1,20	1,16	100,00	2,05	133,00
Colamine	0,06	0,10	0,85	0,10	5,00
Tryptophanne	0,12	0,08	/	/	/
Sarcosine	/	/	/	/	5,62
Ac. Beta-Amino-	/	/	/	/	/
Isobutyrique					
Beta-Alanine	/	/	/	/	/
Ac. Gamma-Amino-	/	/	/	/	/
Butyrique					

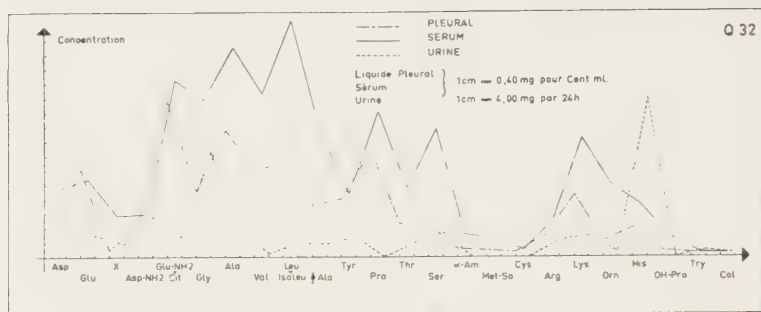


FIG. 27. — Correspondant au tableau n° IX (avant hydrolyse).
Voir FIG. 26.

TABLEAU N° IX

N° 32 NEOPLASIQUE (LIQUIDE PLEURAL)

	HYDROLYSE			HYDROLYSE	
	Pleural mg/100 ml	Sérum mg/100 ml	Urine mg/24 h.	Pleural mg/100 ml	Urine mg/24 h.
Ac. Aspartique	0,71	1,90	3,75	3,17	39,00
Ac. Glutamique	2,44	2,17	6,12	10,15	50,40
"X"	0,18	1,16	3,75	/	/
dosé comme Ac.					
Cystéique					
Asparagine	1,00	1,20	11,30	/	/
Glutamine et	4,25	5,50	5,60	0,38	/
Citrulline					
Glycine	1,85	4,38	29,50	2,82	46,50
Alanine	3,55	5,80	8,00	4,85	17,20
Valine	2,41	4,55	1,00	3,70	15,80
Leucines	2,65	6,55	3,38	5,27	28,50
Phényl-Alanine	1,44	3,50	3,75	3,70	10,00
Tyrosine	1,63	1,76	5,76	1,76	7,50
Proline	2,96	4,05	/	4,88	28,00
Hydroxy-Proline	0,18	0,57	/	0,31	43,00
Thréonine	0,93	1,92	4,00	2,56	10,00
Sérine	0,94	3,55	6,90	2,19	17,50
Acide Alpha-Amino-	0,23	0,62	/	0,12	0,72
Butyrique					
Méthionine-Sulfoxyde	0,18	0,52	/	0,71	/
Cystine	0,14	0,20	/	0,93	12,50
Arginine	0,60	1,00	4,70	1,53	8,61
Lysine	1,72	3,30	5,90	4,00	14,82
Ornithine	0,44	2,00	1,53	0,65	3,10
Histidine	0,82	1,46	44,00	2,38	62,50
Colamine	0,10	0,20	1,00	0,12	4,30
Tryptophanne	/	/	/	/	/
Sarcosine	/	/	/	/	4,00
Ac. Beta-Amino-	/	/	/	/	1,19
Isobutyrique					
Beta-Alanine	/	/	/	/	1,10
Ac. Gamma-Amino-	/	/	/	/	0,66
Butyrique					

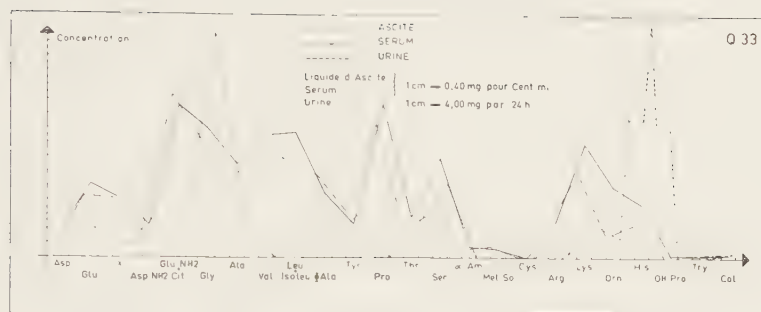


FIG. 28. — Correspondant au tableau n° X (avant hydrolyse).

TABLEAU N° X

	N° 33 NEOPLASIQUE			HYDROLYSE	
	Ascite mg/100 ml	Sérum mg/100 ml	Urine mg/24 h.	Ascite mg/100 ml	Urine mg/24 h.
Ac. Aspartique	0,21	0,79	8,00	2,00	40,00
Ac. Glutamique	1,72	2,06	8,00	8,06	56,20
"X"	1,67	1,65	3,00	/	/
dosé comme Ac.					
Cystéique					
Asparagine	0,75	0,90	12,00	/	/
Glutamine et	4,55	4,26	10,50	0,40	/
Citrulline					
Glycine	3,30	3,60	62,80	5,50	102,00
Alanine	2,12	2,61	13,00	4,00	20,50
Valine	3,04	3,42	/	4,12	8,50
Leucines	2,72	3,50	4,20	5,00	30,50
Phényl-Alanine	2,30	1,82	5,50	3,20	12,00
Tyrosine	1,30	0,96	12,80	0,50	13,00
Proline	3,75	4,32	/	4,25	30,50
Hydroxy-Proline	0,06	0,06	/	0,10	32,00
Thréonine	1,00	1,15	10,00	1,00	13,20
Sérine	1,31	2,82	21,00	1,40	30,00
Ac. Alpha-Amino	0,25	0,32	/	0,20	/
Butyrique					
Méthionine-Sulfoxyde	0,32	0,24	/	0,30	/
Cystine	/	/	/	0,20	10,80
Arginine	0,90	1,00	6,00	1,70	8,60
Lysine	2,42	3,21	10,00	4,00	20,00
Ornithine	0,60	2,00	5,52	0,80	6,00
Histidine	0,95	1,50	125,00	1,50	150,00
Colamine	/	/	/	/	/
Tryptophanne	0,08	0,07	/	/	/
Sarcosine	/	/	/	/	8,00
Ac. Beta-Amino-	/	/	/	/	/
Isobutyrique					
Beta-Alanine	/	/	/	/	/
Ac. Gamma-Amino-	/	/	/	/	/
Butyrique					

Liquides d'épanchement, sérum et urines.

Le dosage simultané des aminoacides dans le sérum, le liquide d'épanchement et les urines de 3 malades ne permet pas d'établir une corrélation entre les liquides d'épanchement et sérums d'une part et les urines d'autre part. (fig. 26, 27, 28).

La détermination de l'aminocidurie ne peut donc pas apporter de renseignements intéressants dans ces états pathologiques.

(Voir tableaux n° VIII, N° IX et n° X) (fig. 26, fig. 27 et fig. 28).

*
* *

D. — Bilan d'un électrophorégramme.

Nous avons vu dans les tableaux n° V n° VI que les taux de la plupart des acides aminés avant et après l'hydrolyse sont augmentés (sauf la tyrosine, la méthionine, etc. qui sont décomposés ou altérés au cours de l'hydrolyse).

Après l'hydrolyse, les acides aminés augmentés d'une manière très importante sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glycoacide et la proline.

L'asparagine et la glutamine à elles seules ne peuvent pas expliquer cette forte augmentation des acides dicarboxyliques.

En général, la quantité d'asparagine représente environ la moitié de l'acide aspartique dosé après hydrolyse : le taux de la glutamine est très variable puisque son écart-type est très grand (tableau n° V).

En généralisant le procédé de récupération des bandes séparées en électrophorèse à pH 3.9 (chapitre n° IV), nous avons réalisé une étude de toutes les bandes ninhydrine positives d'une part (observation n° 10 du liquide d'ascite, tableau n° XI) et de toutes les bandes ninhydrine positives et négatives d'autre part (observation n° 28 du liquide d'ascite, tableau n° XII).

a) Mode opératoire.

Sur un électrophorégramme, 200 μ l de la fraction A sont déposés (dix dépôts de 20 μ l chacun) ; de part et d'autre de ces dépôts, des témoins externes sont soumis à la même séparation électrophorétique : d'une part les aminoacides témoins, acide cystéique, acide aspartique, acide glutamique,

TABLEAU N° XI

N° 10 (mg/100 ml)

	Avant H.T.	X-H.T.	G-H.T.	N-H.T.	B-H.T.	Somme des Fractions	Après H.T.
Ac. Aspartique	0,29	/	0,11	1,00	/	1,11	2,26
Ac. Glutamique	1,05	1,23	1,05	5,10	/	7,38	7,52
"X"	0,70	/	/	/	/	/	/
Asparagine	1,00	/	/	/	/	/	/
Glutamine et Citrulline	6,18	/	/	0,40	/	0,40	0,24
Glycine	3,40	0,07	0,14	2,82	0,02	3,05	6,00
Alanine	2,94	0,03	0,06	3,00	0,01	3,10	4,00
Valine	1,86	0,01	0,01	1,68	0,04	1,77	2,47
Leucines	1,95	0,02	0,07	2,08	/	2,17	3,68
Phényl-Alanine	1,90	/	0,03	1,78	/	1,81	3,12
Tyrosine	1,82	/	/	0,96	/	0,96	0,20
Proline	3,10	/	/	3,00	/	3,00	5,60
Thréonine	0,87	0,01	0,25	1,00	/	1,26	1,22
Serine	1,85	0,02	0,03	1,52	/	1,57	2,06
Ac. Alpha-Am.-But.	0,26	/	/	0,18	/	0,18	0,17
Méthionine-Sulfoxyde	0,60	/	/	0,52	/	0,52	0,38
Cystine	trace	0,25	/	trace	/	0,25	0,28
Arginine	0,55	/	/	0,59	0,56	1,15	1,24
Lysine	2,53	/	/	1,54	2,40	3,94	4,08
Ornithine	0,38	/	/	0,88	0,40	1,28	1,00
Histidine	1,18	/	/	0,32	1,08	1,40	1,30

TABLEAU N° XII

N° 28 (mg/100 ml)

	Avant HT	X-HT	GX-HT	G-HT	GN-HT	N-HT	NB-HT	B-HT	C-HT	Somme des Fract.	Après HT
Ac. Aspartique	0,32	/	0,46	0,19	0,13	1,33	/	trace	/	2,11	2,50
Ac. Glutamique	1,78	0,37	0,31	1,90	0,19	5,65	/	trace	/	8,81	10,42
"X"	0,62	0,03	/	/	/	/	/	/	/	0,03	/
Asparagine	1,30	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Glutamine et Cit.	5,27	/	/	/	/	0,42	/	/	/	0,42	0,46
Glycine	1,92	0,16	/	/	0,14	2,25	/	/	/	2,55	3,55
Alanine	2,66	/	/	0,07	2,81	/	/	/	/	2,94	3,75
Valine	1,98	0,04	/	/	0,07	2,21	/	/	/	2,32	3,22
Leucines	2,52	0,03	/	/	0,13	3,38	/	/	/	3,54	5,27
Phényl-Alanine	2,07	/	/	/	/	2,25	/	/	/	2,25	3,88
Tyrosine	1,73	/	/	/	/	1,25	/	/	/	1,25	1,08
Proline	2,24	/	/	/	trace	3,60	/	/	/	3,60	3,85
Hydroxy-Proline	trace	/	/	/	/	0,40	/	/	/	0,40	0,46
Thréonine	1,24	/	/	/	/	1,16	/	/	/	1,16	2,15
Serine	1,25	0,06	/	/	0,08	1,34	/	/	/	1,48	2,21
Ac. Alpha-Am.-But.	0,34	/	/	/	/	0,40	/	/	/	0,40	0,40
Méthionine-Sulfoxyde	0,66	/	/	/	/	0,35	/	/	/	0,35	0,33
Cystine	trace	/	/	/	/	trace	/	/	/	/	0,70
Arginine	0,86	/	/	/	/	0,23	0,20	0,90	/	1,33	1,85
Lysine	2,70	/	/	/	/	0,50	0,50	3,00	/	4,00	4,75
Ornithine	0,32	/	/	/	/	0,16	trace	0,30	/	0,46	0,58
Histidine	0,72	/	/	/	/	0,36	0,40	0,80	/	1,56	1,52
Méthyl-Histidines	/	/	/	/	/	/	/	0,05	/	0,05	/
Colamine	0,03	/	/	/	/	/	/	/	0,08	0,08	0,10
Tryptophanne	0,10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Ac. Beta-Am.-IsoBu.	/	/	/	/	/	/	0,05	/	/	0,05	/
Beta-Alanine	/	/	/	/	/	/	0,07	/	/	0,07	/
Gamma-Amino-But.	/	/	/	/	/	/	0,04	/	/	0,04	/

alanine et lysine; et d'autre part 10 μ 1/5 ml de la fraction A. (Voir la technique décrite dans le premier chapitre I Ca et la figure 5 « Etudes particulières ».

Cette opération est répétée 20 fois ce qui permet de séparer 4 ml de la fraction A.

Les bandes fortement ninhydrine positives sont repérées grâce à la révélation des témoins externes.

Les abréviations suivantes ont été utilisées :

X = fraction « X »

G = acide glutamique.

N = acides aminés à comportement « neutres ».

B = acides aminés à comportement « basiques ».

Les bandes ninhydrine négatives ou très faiblement positives sont notées de la manière suivante :

GX = la bande qui se situe entre la fraction « X » et la fraction G.

GN = celle comprise entre la fraction G et la fraction N.

NB = celle entre la fraction N et la fraction B.

C = celle située au delà de la fraction B dans le sens de la migration électrophorétique « C » (zone de la colamine).

Chaque bande est découpée puis éluée par de l'eau distillée. L'éluat est desséché complètement par ventilation d'air froid et repris exactement dans 4 ml d'eau. La quantité des acides aminés et des peptides présents dans chaque éluat est donc identique à celle de la fraction correspondante de la fraction A initiale. 2 ml de chaque éluat est hydrolysé totalement par HCl 5.6 N (voir technique, premier chapitre: II D). C'est sur l'hydrolysat de chaque éluat qu'une analyse quantitative systématique (Technique : chapitre V B) est pratiquée.

b) *Résultats.*

Les tableaux n° XI et n° XII rassemblent l'ensemble des résultats obtenus dans les deux observations.

c) *Discussions.*

Un bilan a été établi pour chaque aminoacide en calculant la somme des dosages réalisés après l'hydrolyse de toutes les bandes ninhydrine positives d'une part (tableau n° XI) et de toutes les bandes ninhydrine négatives d'autre part (tableau n° XII). Cette somme peut être utilement

comparée pour chaque acide aminé au résultat obtenu en partant de l'hydrolysât global de la fraction A elle-même.

Ainsi, si l'on établit le bilan de l'acide aspartique, il est intéressant de noter (*) que la somme des fractions ninhydrine positives (tableau n° XI) correspond à peine à la moitié de la quantité trouvée dans l'hydrolysât total de la fraction A non séparée : ceci signifie qu'une partie non négligeable, environ la moitié, de l'acide aspartique, se trouve sous diverses formes combinées, ninhydrine négatives, en particulier dans les fractions « GX », « G » et « GN » : ce fait est d'ailleurs très normal et ne saurait surprendre puisque l'on sait que les formes N-Acylées de l'acide aspartique (N-formyl, N-Acétyle...) qui sont faiblement ou très faiblement ninhydrine positives, ont une migration électrophorétique à pH 3,9 intermédiaire entre celle de la fraction X et celle de l'acide glutamique.

Le bilan de l'acide glutamique montre qu'une grande partie de l'acide glutamique combiné est localisée dans la bande des « Neutres » ; la presque totalité de l'acide glutamique libéré par hydrolyse des « Neutres » provient de la glutamine.

En outre la quantité d'acide glutamique combiné dans les autres bandes et notamment dans la fraction « X » est extrêmement variable ainsi que le montre la dispersion des résultats.

Le bilan des aminoacides à comportement basique montre que la presque totalité des aminoacides « Basiques » de la fraction A est constituée par les acides aminés basiques libres et par certains peptides à comportement électrophorétique « Neutre ». Toutefois une partie de l'ornithine prouvée peut provenir après hydrolyse de la décomposition de la citrulline qui a un comportement neutre en électrophorèse à pH 3,9.

En ce qui concerne les acides aminés « Neutres », la somme des fractions éluées est, dans la plupart des cas, inférieure au taux trouvé dans l'hydrolysât total de la fraction A. Or, mis à part quelques exceptions, on retrouve très peu d'acides aminés « neutres » dans les hydrolysats de toutes les fractions à comportement basique ou acide.

L'origine de cette différence est inexpliquée. Certes, la méthode que nous avons utilisée avec toutes les difficultés qu'elle comporte est entachée d'une erreur par défaut de l'ordre de 20 pour cent. De toute façon, nous l'avons utilisée surtout en vue de repérer les formes combinées qui auraient pu

* Que parmi les fractions ninhydrine positives, c'est la bande des « neutres » qui après hydrolyse, fournit la majeure partie de l'acide aspartique : il s'agit effectivement de l'asparagine qui est l'un des principaux responsables de l'augmentation de l'acide aspartique dans l'hydrolysât total.

éventuellement exister en quantité importante : par exemple, nous pouvons dire que le liquide d'ascite ne contient certainement pas de quantité massive d'acide hippurique, puisque l'augmentation du glycoecolle n'est pas significative dans les hydrolysats totaux et dans les éluats des différentes fractions séparées. Le liquide d'ascite se comporte donc à ce sujet très différemment de l'urine. (Voir les tableaux n° VIII, IX et X).

D'autre part, la méthode décrite nous a permis également de déceler et de doser approximativement les quantités d'acides ω -aminés qui se trouvent seulement à l'état de traces peu dosables dans les liquides initiaux. La concentration réalisée après 20 récupérations nous permet d'identifier avec certitude l'acide gamma-aminobutyrique, l'acide bêta-amino-isobutyrique et la bêta alanine dans leur zone électrophorétique habituelle. Leur concentration est toujours très faible. Il y a donc, là encore, une différence fondamentale avec l'urine où les taux trouvés après hydrolyse sont toujours nettement plus élevés.

SEPTIEME CHAPITRE

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de notre travail, nous avons tout d'abord décrit les méthodes que nous avons utilisées pour le fractionnement électrophorétique et chromatographique et qui sont applicables à l'isolement, à l'identification et au dosage des acides aminés des milieux biologiques étudiés (liquide d'ascite, liquide pleural, sérum et urine).

Nous avons particulièrement insisté sur le couplage des méthodes électrophorétiques et chromatographiques qui conduisent à des résultats plus satisfaisants que la chromatographie sur papier seule.

Après une séparation de base à pH 3,9 qui sépare essentiellement 5 groupes (acide aspartique, acide glutamique, acides aminés « Neutres », acides aminés « Basiques » et les amines), nous réalisons des couplages électrochromatographiques (électrophorèse à pH 3,9 + chromatographie dans le butanol-acétique et électrophorèse à pH 2,4 + chromatographie dans le butanol-acétique) ou des électrophorèses complémentaires (pH 11,7; pH 6,5) qui réalisent la séparation de tous les composés présents.

L'aspect quantitatif a été réalisé en utilisant l'élution des taches colorées par révélation obtenue après trempage du chromatogramme dans une solution de ninhydrine concentrée et tamponnée.

Nous avons groupé les divers liquides ascitiques selon leur origine étiologique et nous avons tenté de dégager, si elles existent, les variations qualitatives et quantitatives affectant certains acides aminés selon l'origine du liquide d'ascite.

Nous avons suggéré que la connaissance de ces variations ainsi que la comparaison de la composition en aminoacides du liquide d'ascite et du sérum permettrait d'aborder sous un jour nouveau le problème délicat que pose l'apparition d'un liquide d'ascite afin d'en comprendre la physiopathologie.

L'aspect qualitatif des résultats est rassemblé dans le chapitre III.

Nous avons identifié les acides aminés suivants :

— *En quantités importantes* : la glutamine, la proline, la lysine, le glyco-
cocolle, l'alanine, la phénylalanine, la valine, les leucines et l'histidine.

— *En quantités variables mais assez faibles* : la sérine, la tyrosine, la thréonine, l'arginine, la citrulline, la méthionine, la cystine et l'ornithine.

— *En très faible quantité* : l'acide alpha-amino-butyrique, l'hydroxyproline, la méthylhistidine, le tryptophane, les acides omega-aminés (après hydrolyse), l'acide aspartique (avant hydrolyse) et la colamine.

La présence inconstante et en quantité variable de l'acide pipécolique peut également être signalée.

Quelques problèmes particuliers se sont présentés à propos de la cystine, de la méthionine et de la citrulline.

La cystine est identifiée après l'oxydation sous forme d'acide cystéïque.

La méthionine est oxydée « in vitro » au cours de l'élution par une ventilation d'air chaud : il se forme de la méthionine sulfoxyde.

La citrulline occupe le même emplacement que la glutamine. Sa présence peut être décelée par la coloration jaune obtenue avec le réactif qu'est le paradiméthyl-aminobenzaldéhyde.

D'autre part, après hydrolyse, la glutamine disparaît et, à l'emplacement sur le chromatogramme, il ne subsiste que la citrulline.

Au cours de cette étude nous avons décelé un composé « X » qui est ninhydrine positif, assez résistant vis-à-vis de l'hydrolyse chlorhydrique, qui possède vraisemblablement un groupe disulfure et qui a un groupe alpha-aminé libre dinitro-phénylable. Il possède une migration électrophorétique dans la zone acide.

Après hydrolyse, on trouve *souvent* de la cystine.

Il est possible que ce dérivé ait des analogies structurales avec

S — (2-méthyl-2 carboxyl-éthyl) — cystéïne, ou

S — (1, 1', diméthyl-2-carboxyl-éthyl) — cystéïne

dont la présence a été soit suspectée soit décelée dans l'urine humaine.

En somme, ce composé « X » est acide, dinitrophénylable, contient un résidu de cystine dont le groupe alpha-aminé est libre.

L'aspect quantitatif est exposé dans les tableaux n° V et n° VI.

Dans le tableau n° V, nous avons comparé nos résultats avec ceux qui sont obtenus par d'autres auteurs. Nous avons soumis au test de STUDENT les résultats des dosages d'aminoacides libres et totaux de 32 liquides d'ascite en les groupant selon leur origine étiologique : éthylique (tableau n° I), cardiaque (tableau n° II) et néoplasique (tableau n° III).

Le tableau n° VII indique les valeurs moyennes des dosages des acides aminés libres et totaux pour chacune des trois catégories.

Nous avons constaté que peu de différences significatives sont à enregistrer selon l'origine étiologique des liquides étudiés. Toutefois, la comparaison des liquides d'origine éthylique et néoplasique permet de constater chez ces derniers une augmentation significative du taux de la valine avant et après hydrolyse, ainsi que du taux des leucines après hydrolyse totale.

Les liquides d'origine cardiaque, comparés aux liquides néoplasiques, présentent une teneur moindre en arginine après hydrolyse ainsi qu'en proline libre. Inversement, les liquides d'origine cardiaque ont une concentration en ornithine supérieure à celle des liquides d'origine éthylique.

Ces résultats, malgré le caractère limité de leurs conclusions, ne sont cependant pas dépourvus d'intérêt : outre le document analytique qu'ils représentent, peut-être pourront-ils être utilisés en tant que données physiopathologiques pour expliquer certaines déviations métaboliques des acides aminés.

Il nous a paru également intéressant de doser simultanément chez trois malades les acides aminés dans le liquide d'épanchement, le sérum et l'urine. Les chiffres comparatifs et les graphiques correspondants sont présentés dans les tableaux n° VIII, IX et X.

Les graphiques sont présentés dans les figures 26, 27 et 28.

Ils nous montrent surtout que le taux des acides aminés des liquides d'épanchement reflète fidèlement le taux sérique. Par contre, il ne semble exister aucune corrélation entre ces deux taux (sanguins et épanchements) et celui des acides aminés urinaires.

Enfin, au cours de l'étude de cet aspect quantitatif, nous avons essayé de déterminer la quantité de formes combinées d'acides aminés que l'on peut déceler dans ces milieux biologiques. Nous avons en effet constaté des différences assez nettes entre les résultats de dosage avant et après hydrolyse, l'augmentation ne pouvant provenir que de l'hydrolyse de formes combinées ou de peptides. L'augmentation de l'acide aspartique s'explique à la fois par l'hydrolyse de l'asparagine et de certaines formes combinées d'acides aminés. L'augmentation de l'acide glutamique provient de l'hydrolyse de la glutamine, de l'acide pyroglutamique et de quelques peptides acides assez dispersés.

Pour les acides aminés à comportement « Basiques » et « Neutres », le problème est beaucoup plus complexe et il est impossible de trouver des formes combinées précises. Toutefois, on peut éliminer la présence massive de dérivés tels que l'acide hippurique, que nous avons trouvé à des concentrations élevées dans d'autres milieux biologiques comme l'urine.

BIBLIOGRAPHIE

1. P. BOULANGER, G. BISERTE et F. COURTOT.
Bull. Soc. Chim. Biol., **34**, 366, 1952.
2. F. DUBUISSON-COURTOT. Aminoacides et peptides urinaires.
Thèse Pharmacie, n° 209, Lille, 1953.
3. S. M. PARTRIDGE.
Biochem. J., **42**, 241, 1948.
4. A. L. LÉVY et D. CHUNG.
Anal. Chem., **25**, 396, 1953.
5. H. MICHL.
Monatsh. Chem., **82**, 489, 1951.
6. G. BISERTE, T. PLAQUET-SCHOONAERT, P. BOULANGER et P. PAYSANT.
J. of Chromatog., **3**, 25, 1960.
7. J. I. HARRIS, F. SANGER et M. A. NUAGHTON.
Arch. Biochem. Biophys., **65**, 427, 1956.
8. G. BISERTE.
Bull. Soc. Chim. Biol., **39**, 661, 1957.
9. M. BOULANGÉ, HAN KIKI et H. BECK.
Ann. Biol. Clin., n° 1-2, 1959.
10. R. J. BLOCK. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis.
N. Y. Acad. Press, 1958.
11. L. FOWDEN.
Nature **167**, 1 030, 1951.
12. G. TOENNIES et J. J. KOLB.
Anal. Chem., **23**, 823, 1951.
13. R. ACHER, G. FROMAGEOT et M. JUTISZ.
Biochim. Biophys. Acta, **5**, 81, 1950.
14. I. SMITH.
Nature, **171**, 43, 1953.
15. J. B. JEPSON et I. SMITH.
Nature, **172**, 1 100, 1953.
16. G. HOGSTROM.
Acta Chem. Scand., **11**, 743, 1957.
17. G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE, P. SAUTIERE.
J. Chromatog., **2**, 225, 1959.
18. T. P. ELLIS, W. W. NOWINSKI et J. G. BIERL.
Texas Rept. Biol. Med., **11**, 231, 1953.
19. M. BOULANGÉ.
Viertes Freiburger Symposium über Pathologie, 1956. Springer Verl.
p. 116-123.
20. H. G. KNAUFF, H. SELMAIR et H. ZICKGRAF.
Z. Physiol. Chem., **318**, 73, 1960.

- 21 S. MOORE, D. H. SPACKMAN et W. H. STEIN.
Anal. Chem., **30**, 1185, 1958.
- 22 E. SCHRAM, S. MOORE et E. J. BIGWOOD.
Biochem. J., **57**, 33, 1954.
- 23 S. C. PAN et J. D. DUTCHER.
Anal. Chem., **28**, 836, 1956.
- 24 SHUNZI MIZUHARA et SHINJI OOMORI.
Arch. Biochem. et Biophys., **92**, 53, 1961.
- 25 A. PELSON et R. W. G. WYCKOFF.
Science, **108**, 501, 1948.
- 26 H. K. BERRY et L. CAIN.
Arch. Biochem. Biophys., **24**, 179, 1949.
- 27 R. B. FISCHER, D. S. PARSONS et G. A. MORRISON.
Nature, **161**, 764, 1948.
- 28 R. B. FISCHER, D. S. PARSONS et R. HOLMES.
Nature, **164**, 183, 1949.
- 29 M. JUTISZ.
Thèse de Doctorat, 1949.
- 30 R. R. REDFIELD et E. S. G. BARRON.
Arch. Biochem. Biophys., **35**, 443, 1952.
- 31 A. A. ALBANESE et M. LEIN.
Science, **110**, 163, 1949.
- 32 R. J. BLOCK.
Anal. Chem., **22**, 1327, 1950.
Science, **108**, 608, 1948.
- 33 H. ROTTGER.
Experientia, **9**, 150, 1953.
- 34 H. B. BULL, J. W. HAHN et V. H. BAPTIST.
J. Am. Chem. Soc., **71**, 550, 1949.
- 35 T. WIELAND et L. WIRTH.
Chem. Ber., **82**, 468, 1949.
- 36 E. M. CROOK, H. HARRIS, F. HASSAN, F. L. WARREN.
Biochem. J., **56**, 434, 1954.
- 37 W. GRASSMANN, K. HANNIG et M. PLÖCKL.
Z. Physiol. Chem., **299**, 258, 1955.
- 38 T. WIELAND et L. WIRTH.
Angew. Chem., **63**, 171, 1951.
- 39 L. NAPIHTALIN.
Nature, **161**, 763, 1948.
- 40 A. J. LANDAU et J. AWAPARA.
Science, **109**, 385, 1949.
- 41 A. J. WOJWOD.
Nature, **166**, 272, 1950.
- 42 A. SZENT-GYORGYI.
Science, **126**, 751, 1957.
- 43 E. R. COOK, M. LUSCOMBE.
Nature, **180**, 708, 1957.
- 44 R. A. BOISSONNAS.
Helv. Chim. Acta, **33**, 1966, 1950.
- 45 R. A. BOISSONNAS.
Helv. Chim. Acta, **33**, 1971-1982, 1950.

- 46) L. FOWDEN.
Biochem. J. **48**, 327, 1951.
- 47) A. J. MARTIN, et R. MITTELMAN.
Biochem. J., **43**, 353, 1948.
- 48) A. J. WOJWOD.
Biochem. J., **45**, 412, 1949.
- 49) Y. KURODA.
J. Biochem. Japan., **38**, 115, 1951.
- 50) A. M. SMITH, A. H. AGIZA.
Analyst, **76**, 623, 1951.
- 51) E. F. WELLINGTON.
Can. J. Chem., **30**, 581, 1952; **31**, 484, 1953.
- 52) J.-F. THOMPSON, R.-M. ZACHARIUS et F.-C. STEWARD.
Plant Physiology, **26**, 375, 1951.
- 53) P. R. LEWIS.
Biochem. J., **52**, 330, 1952.
- 54) G. BISERTE, P. PAYSANT et P. BOULANGER.
Path. Biol., **7**, 1529, 1959.
- 55) G. BISERTE, P. BOULANGER, P. PAYSANT et T. SCHOONAERT.
Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 1958.
- 56) P. H. BELL et Coll.
J. Am. Chem. Soc., **78**, 5051, 1956.
- 57) J. BRETON. Etudes Cliniques et Biologiques sur la Ninhydrine, Réactif des Acides Aminés
Bordeaux, Imprimerie E. Drouillard, 3, place de la Victoire (1958).
- 58) H. A. HARPER.
Rev. of Physiol. Chem., 1959.
Lange Med. Publ.) California.
- 59) E. ABDERHALDEN et H. SCHMIDT.
Z. Physiol. Chem., **72**, 37, 1911.
- 60) W. GRASSMANN et K. VON ARNIM.
Ann. Chem., **509**, 288, 1934.
- 61) A. W. JOHNSON et D. J. MCGALDIN.
J. Chem. Soc., 821, 1958.
- 62) N. GROBBELAAR, J. K. POLLARD, F. C. STEWARD.
Nature, **175**, 703, 1955.
- 63) W. H. STEIN et S. MOORE.
J. Biol. Chem., **211**, 915, 1954.
- 64) J. BLASS, M. CACHIN et J. DURLACH.
Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris, **66**, 1253, 1950.
- 65) J. E. SEEGMILLER, R. SCHWARTZ et C. S. DAVISON.
J. Clin. Invest., **33**, 984, 1954.
- 66) D. J. MCGALDIN.
Chem. Reviews **60**, N° 1, 39, 1960.

TABLE DES MATIÈRES

PREMIER CHAPITRE

I. — TECHNIQUES GENERALES	11
A — <i>Déminéralisation</i>	11
B. — <i>Chromatographie bidimensionnelle</i>	12
C — <i>Electrophorèse</i>	12
a) <i>Electrophorèse à pH 3,9</i>	12
b) <i>Electrophorèse à pH 11,7</i>	13
c) <i>Electrophorèse à pH 6,5</i>	14
D — <i>Couplages bidimensionnels</i>	14
a) <i>Electrophorèse à pH 3,9</i>	14
<i>Chromatographie dans le système butanol-acétique.</i>	
b) <i>Electrophorèse à pH 2,4</i>	14
<i>Chromatographie dans le système butanol-acétique.</i>	
E. — <i>Discussion des techniques</i>	15
II. — TECHNIQUES PARTICULIERES	16
A — <i>Elution des bandelettes</i>	16
B — <i>Emploi des témoins</i>	17
a) <i>divers</i>	17
b) <i>externes</i>	17
c) <i>internes</i>	18
C — <i>Emploi des révélations à la ninhydrine et des révélations spécifiques</i>	18
a) <i>Révélation à la Ninhydrine</i>	18
1) <i>Ninhydrine à 0,1 %</i>	18
2) <i>Ninhydrine à 1 %</i>	18
b) <i>Révélation spécifique</i>	19
1) <i>Réactif d'Ehrlich (paradiméthyl-amino-benzaldéhyde).</i>	19
2) <i>Réactif au Nitroprussiate</i>	19
3) <i>Réactif à l'isatine</i>	19
4) <i>Réactif de Jepson et Smith</i>	19
D — <i>Conditions d'hydrolyse</i>	20
E. — <i>Résolution de problèmes délicats d'identification</i>	20
a) <i>Couplage électrophorèse à pH 2,4 et chromatographie dans le système butanol-acétique</i>	20
1) <i>Citrulline</i>	20
2) <i>Cystine</i>	21
3) <i>Proline</i>	21
4) <i>Hydroxyproline</i>	21
5) <i>Asparagine</i>	22
b) <i>Couplage électrophorèse à pH 3,9 et chromatographie dans le système butanol-acétique</i>	22
1) <i>Glutathion</i>	22
2) <i>Cystine-N-Acétyle</i>	23
3) <i>Acide-N-Acétyle-Aspartique et Acide-N-Acétyle-Glutamique.</i>	23
c) <i>Séparation Leucine-Isoleucine</i>	23
F — <i>Chromatographie des dérivés dinitrophénylés</i>	23

DEUXIEME CHAPITRE

HISTORIQUE ET BUT DU TRAVAIL	25
------------------------------------	----

TROISIEME CHAPITRE

ETUDES QUALITATIVES SUR LE LIQUIDE D'ASCITE	27
A — Préparation de la composante Aminoacide	28
B — Electrophorèse à pH 3,9	29
C — Chromatographie bidimensionnelle	30
a) Avant hydrolyse	30
b) Après hydrolyse	31
D — Etude de la zone des Neutres	31
a) Chromatographie Bidimensionnelle	32
1) Cystine	33
2) Methionine	33
3) Citrulline	34
b) Couplage bidimensionnel	35
c) Séparation leucine-isoleucine	36
E — Etude de la zone des composés basiques	37
a) Chromatographie Bidimensionnelle	37
b) Electrophorèse à pH 11,7	37
c) Electrophorèse à pH 6,5	37
F — Acide Aminé à comportement Acide	38
a) Electrophorèse à pH 3,9	38
b) Couplage bidimensionnel	39
Electrophorèse à pH 3,9	39
Chromatographie dans le système butanol-acétique	39

QUATRIEME CHAPITRE

ESSAIS D'IDENTIFICATION DU COMPOSE « X »	41
A — La fraction « X » séparée à partir de la fraction « A » par electrophorèse à pH 3,9	41
B — Hydrolyse totale de la fraction « X » et analyse quantitative de l'hydrolysate	41
C — Deuxième separation de la fraction « X » par chromatographie unidimensionnelle	42
$X = \sum_{i=1}^{10} X_i$	
a) l'hydrolyse de X1 et X2	43
b) l'hydrolyse de X4, X5, X6	43
c) l'hydrolyse de X7, X8, X9, X10	43
d) Etude de X3	44
1) Tests d'homogénéité	44
2) Révélation spécifique sur un électrochromatogramme de X3	45
a) Rydon-Smith modifié	45
b) Vert de Bromocrésol	46
c) Nitronrussiate et le cyanure de sodium	46

3) l'hydrolyse totale de X3	46
α) Electrophorèse de l'hydrolysat de X3 à pH 3,9	46
i) Couplage électro-chromatographique des Acides aminés « Neutres » de l'hydrolysat de X3	46
ii) Chromatographie bidimensionnelle des Acides aminés « Neutres » de l'hydrolysat de X3 avant et après oxydation	46
iii) Electrophorèse à pH 11,7 des Acides aminés « Basiques » de l'hydrolysat de X3	46
β) Couplage électro-chromatographique de l'hydrolysat de X3 (pH 3,9 et butanol-acétique)	47
γ) Electrophorèse à pH 3,9 de l'hydrolysat de X3 avant et après oxydation	47
δ) Chromatographie bidimensionnelle de l'hydrolysat de X3 avant et après oxydation	47
4) Dinitrophénylation de X3	47
α) Chromatographie bidimensionnelle classique de la phase aqueuse de l'hydrolysat de DNP-X3	48
β) Chromatographie bidimensionnelle dans le système toluène-phosphate de la phase éther de l'hydrolysat de DNP-X3	48
i) Synthèses des dérivés de DNP-Cystine et DNP-Cystéine	48
D — Conclusions d'après ces données	49

CINQUIEME CHAPITRE

METHODES DE CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE	51
A — Généralités	51
a) Estimation directe	51
1) Comparaison visuelle	51
2) Mesure de la surface	51
3) Densitométrie	52
4) Analyse par rétention	52
b) Elution suivie d'une colorimétrie	53
1) Localisation	53
2) Colorimétrie du liquide d'élution	54
c) Elution et Spectrophotométrie de la Coloration développée directement sur papier	54
d) Discussion de la valeur des méthodes	55
B — Mode opératoire de la technique	57
a) Révélation - Elution - Dosage	58
b) Construction des Courbes	59
c) Conclusions	62
C — Addendum	63
Principe de la réaction à la ninhydrine	63

SIXIEME CHAPITRE

ANALYSE QUANTITATIVE DES AMINOACIDES DES LIQUIDES D'ASCITE	68
A — <i>Bilans analytiques</i>	68
a) Résultats généraux	68
b) Problèmes particuliers	69
1) Méthionine sulfoxyde	69
2) Cystine	70
3) Citrulline	71
4) Glutamine	71
5) Hydroxyproline	72
6) Tryptophane	12
7) Leucine-Isoleucine	27
8) Tyrosine	72
9) Acide-alpha-amino-butyrique	73
10) Méthyl-histidine	73
11) Acide-o-aminés	73
12) Acide pipécolique	73
13) Colamine	73
14) Composé « X »	73
B — <i>Comparaison des résultats en fonction de l'étiologie du liquide d'ascite</i>	74
C — <i>Dosages comparatifs dans le liquide d'ascite, le sérum et l'urine.</i>	78
D — <i>Bilan d'un électrophorégramme</i>	82
a) Mode opératoire	82
b) Tableaux	83
c) Discussions	83

SEPTIEME CHAPITRE

CONCLUSIONS GENERALES	86
---------------------------------	----

DEUXIEME THESE :

Proposition donnée par la Faculté :

La Structure des Protéïnes

VU ET APPROUVÉ :

NANCY, le 29 Avril 1961,

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. ROUBAULT

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

NANCY, le 2 Mai 1961,

*Le Recteur de l'Académie de Nancy,
Président du Conseil de l'Université,*

P. IMBS

IMPRIMERIE LEMOY

32 ter, Place des Vosges - NANCY

Dépôt légal : Deuxième trimestre 1961

**IMPRI
MERIE
LEMOY**
32^{ème}, Pl. des Vosges
NANCY - Tél. 52.83.35